

Peptide und Peptidnukleinsäuren zur Markierung und Organisation von Rezeptoren auf lebenden Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dipl.-Chem. Katharina Gröger

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

1. Gutachter: Prof. Oliver Seitz
2. Gutachter: Prof. Dorothea Fiedler
3. Gutachter: Prof. Kathrin Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2018

Kurzzusammenfassung

Nukleinsäuren und ihre Analoga, sowie peptidische Strukturen bieten die Möglichkeit, Kontrolle über molekulare Prozesse in lebenden Zellen auszuüben. In dieser Arbeit werden Konzepte vorgestellt, in welchen strukturgebende Elemente wie Coiled-Coil-Peptide oder PNA-DNA-basierte Strukturen genutzt werden, um Rezeptoren auf lebenden Zellen zu markieren und in ihrem Verhalten zu modulieren, oder cytosolische Proteine in ihrem Bindungsverhalten zu steuern.

In dem ersten vorgestellten Konzept wird die Peptid-Peptid-Interaktion des Coiled-Coil-Paars K3/E3 genutzt, um eine proximitätsvermittelte Transferreaktion, in welcher eine PNA-Sequenz vom K3-Donor auf den E3-Akzeptor selektiv übertragen wird, zu induzieren. Durch die Fusion des Akzeptorpeptids mit einem membranständigen Rezeptor können kovalent verknüpfte PNA-Rezeptorkonjugate auf der Oberfläche lebender Zellen geschaffen werden. Dabei wurde eine *native chemical ligation*-artige Reaktion genutzt, welche unter Anwendung von arylischen Thioestern einen schnellen Transfer ermöglicht (2 min). So wurden die Rezeptoren hY₁R und hY₂R aus der Familie der GPCR und der EGFR aus der Familie der RTK mit einem PNA-Strang versehen und über Zugabe einer fluoreszenten PNA oder DNA nachfolgend selektiv markiert. Zusätzlich konnte die Anwendung verzweigter DNA-Architekturen mit mehreren Fluorophoren genutzt werden, um die Helligkeit der Markierung quantitativ zu erhöhen. Die PNA-EGFR-Konjugate wurden in einem neuartigen Ansatz durch eine zweifach komplementäre und somit zwei Rezeptoren verbrückende Cy3-DNA adressiert und so zeitgleich markiert und dimerisiert. Durch diese artifiziell herbeigeführte Verbrückung zweier Rezeptoren wurde die Rezeptoraktivität gesteigert, was durch Western Blot-, Immunofluoreszenz- und Fluoreszenzmikroskopieanalyse demonstriert werden konnte. Diese Methode ermöglicht somit die simultane Visualisierung und Modulation von Rezeptoren und ihrer Aktivität.

In zwei anderen Ansätzen wurden Coiled-Coil-basierte Systeme genutzt, um i) zeitgleich zwei verschiedene Akzeptorpeptide mit unterschiedlichen Fluorophoren zu markieren und ii) Coiled-Coil-Peptide in einer schaltbaren Anwendung zu nutzen. Letzterer Ansatz verbindet auf innovative Weise den Gebrauch von Peptidstrukturen mit dem Konzept der überhangvermittelten Strangverdrängung. Durch die asymmetrische Verlängerung von K3/E3-Paaren mit Coiled-Coil-Sequenzen kann die Interaktion „AN“ und „AUS“ geschaltet werden. Dies konnte in einem Fluoreszenzassay mit FAM-E3- und Dabcyl-K3-basierten Peptiden gezeigt und in einer direkten Anwendung an der Syk-Kinase demonstriert werden. Die Liganden der Syk-Kinase wurden dafür an den schaltbaren Peptiden angebracht und konnten gezielt vom bi- in den monovalenten Zustand gebracht und damit die Affinität der Syk-Kinase kontrolliert werden.

Abstract

Nucleic acids, including their analogues, as well as peptidic structures can be used to obtain control over molecular processes within living cells. This work presents a spectrum of concepts, how structural elements as coiled-coil peptides or PNA-DNA-based structures can be used to label and modulate receptor behavior on living cells and how ligand binding of cytosolic proteins can be controlled.

For the first concept the K3/E3-coiled-coil peptide pair was used to establish a proximity-guided, covalent transfer of a PNA strand from a K3-donor peptide onto the complementary E3-acceptor peptide. The fusion of the acceptor peptide to a receptor was used to selectively generate PNA-receptor-conjugates on living cells. A set of PNA-K3-donor-conjugates was tested for PNA-transfer efficacy via a type of native chemical ligation reaction and aryl thioesters were found to be most suitable, as the PNA-transfer proceeded fast (2 min). The receptors hY₁R and hY₂R from the family of GPCRs and the EGFR belonging to the RTK family were tagged with a PNA-sequence selectively and subsequently labeled by the addition of a fluorescent DNA or PNA. By recruiting branched DNA architectures which were decorated with several fluorophores, the total brightness of the labeling was increased quantitatively. In a novel approach a twice complementary Cy3-DNA was used to simultaneously label and dimerize the EGFR. Thereby, an artificially induced increase in receptor activity could be achieved, which was shown in Western Blot and immunofluorescence analysis as well as in fluorescence microscopy. This method thus enables the parallel visualization and control of receptors and their function.

In two other approaches coiled-coil peptides were used to i) label two different acceptor peptides simultaneously with two different dyes and ii) introduce coiled-coil peptides as part of a dynamic switchable system. The latter combined the use of peptidic structures with the concept of overhang-induced strand displacement in an innovative manner. Using an asymmetric coiled-coil elongation on the K3/E3 pair the interaction of both can be turned "ON" and "OFF". This was demonstrated first in a fluorescence assay on FAM-E3 and dabcy1-K3-derived peptides and then applied on the Syk kinase, where Syk ligands were attached to the switchable peptides. Those ligands were changed from a bi- to a monovalent presentation status and thus the affinity of the Syk kinase towards its ligands could be controlled.

Die experimentellen Arbeiten wurden in dem Zeitraum von Januar 2013 bis Mai 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie (Fachbereich: Organische und Bioorganische Chemie) der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1) Einleitung | 1 |
| 2) Stand der Forschung | 3 |
| 2.1) Proteinmarkierung und -modifikation | 3 |
| 2.2) Coiled-Coil-Peptide zur Proteinmarkierung..... | 7 |
| 2.2.1) Struktur von Coiled-Coil-Peptiden | 7 |
| 2.2.2) Ausgewählte Anwendungen von Coiled-Coil-Peptiden als Strukturelemente..... | 8 |
| 2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR | 11 |
| 2.3.1) Grundlagen der Rezeptoroligomerisierung..... | 11 |
| 2.3.2) Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor..... | 12 |
| 2.4) PNA-DNA- und DNA-DNA-Interaktionen in der proteinbiologischen Anwendung..... | 15 |
| 2.4.1) Strukturelle Merkmale von PNA-DNA- und DNA-DNA-Doppelsträngen | 15 |
| 2.4.2) DNA- / PNA-basierte Methoden in der Proteinbiologie | 17 |
| 3) Zielstellung..... | 29 |
| 4) Ergebnisse und Diskussion | 35 |

SEKTION I

| | |
|--|-----------|
| 4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren..... | 35 |
| 4.1.1) Konzept der PNA-Donoren auf Basis von Coiled-Coil-Peptiden | 35 |
| 4.1.2) Synthese von PNA-Peptid-Konjugaten | 37 |
| 4.1.3) Transferexperimente | 51 |
| 4.1.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.1)..... | 60 |
| 4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung | 61 |
| 4.2.1) Selektive PNA-Konjugation an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren | 61 |
| 4.2.2) Selektive PNA-Konjugation an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor | 70 |
| 4.2.3) Multi-Marker zur verstärkten Markierung am EGFR | 74 |
| 4.2.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.2)..... | 77 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR nach PNA-Transfer..... | 78 |
| 4.3.1) EGFR-Dimerisierung und –Aktivierung..... | 78 |
| 4.3.2) Induzierte EGFR-Dimerisierung durch PNA-Transfer..... | 83 |
| 4.3.3) Diskussion zur EGFR-Dimerisierung..... | 101 |
| 4.3.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.3) | 103 |

SEKTION II

| | |
|--|------------|
| 4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung..... | 107 |
| 4.4.1) Konzept | 107 |
| 4.4.2) Sequenzen und Synthese..... | 108 |
| 4.4.3) Einfacher Fluorophortransfer über orthogonale Coiled-Coil-Peptide..... | 110 |
| 4.4.4) Paralleler Fluorophortransfer über orthogonale Coiled-Coil-Peptide..... | 114 |
| 4.4.5) Paralleler Fluorophortransfer an GPCRs..... | 117 |
| 4.4.6) Zusammenfassung von Kapitel 4.4) | 119 |
| 4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation | 120 |
| 4.5.1) Konzept der Peptid-Strangverdrängung..... | 120 |
| 4.5.2) Erste Generation: Schalten..... | 122 |
| 4.5.3) Zweite Generation: Kreislauf..... | 124 |
| 4.5.4) Anwendung an der Syk-Kinase..... | 129 |
| 4.5.5) Zusammenfassung von Kapitel 4.5) | 135 |

SEKTION III

| | |
|--|------------|
| 4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags | 139 |
| 4.6.1) Die PNA-Strangverdrängung..... | 139 |
| 4.6.2) Schaltbarkeit des PNA-tags an einem GPCR | 145 |
| 4.6.3) Schaltbarkeit des PNA-tags am EGFR..... | 147 |
| 4.6.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.6) | 149 |
| 4.7) PNA-Oligomere zur kontrollierten Liganddimerisierung | 150 |
| 4.7.1) Konzept der PNA-gesteuerten EGF-Präsentation..... | 150 |
| 4.7.2) Synthese von PNA-EGF-Konjugaten..... | 151 |

| | |
|--|------------|
| 4.7.3) Optimierung der PNA-Protein-Konjugate | 154 |
| 4.7.4) Faltung von EGF und EGF-PNA-Konjugaten | 156 |
| 4.7.5) Zusammenfassung von Kapitel 4.7 | 157 |
| 4.8) Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer | 158 |
| 5) Zusammenfassung und Ausblick | 163 |
| 5.1) Zusammenfassung | 163 |
| 5.2) Ausblick | 170 |
| 6) Experimenteller Teil | 173 |
| 6.1) Materialien | 173 |
| 6.1.1) Reagenzien | 173 |
| 6.1.2) Lösungsmittel und Materialien für die Chromatographie | 174 |
| 6.1.3) Oligonukleotide und Vektoren | 174 |
| 6.1.4) Materialien für biochemische Arbeiten | 175 |
| 6.1.5) Puffer | 176 |
| 6.2) Geräte | 177 |
| 6.3) Allgemeine Arbeitsprotokolle | 182 |
| 6.3.1) Manuelle Peptidsynthese | 182 |
| 6.3.2) Automatisierte Peptidsynthese | 184 |
| 6.3.3) Manuelle PNA-Synthese | 186 |
| 6.3.4) Freisetzung der Peptide und PNA-Oligomere vom Harz | 188 |
| 6.3.5) Fmoc-Monitoring | 189 |
| 6.3.6) Herstellung funktionaler PNA-Peptid-Konjugate (CuAAC / SPAAC) | 190 |
| 6.3.7) Native chemische Ligation zur PNA-Protein-Konjugation | 190 |
| 6.3.8) Quantifikation von Peptiden sowie PNA- und DNA-Oligonukleotiden | 191 |
| 6.3.9) Bestimmung von Extinktionskoeffizienten | 191 |
| 6.3.10) Denaturierungsexperimente | 193 |
| 6.3.11) Fluoreszenzmikroskopie | 194 |
| 6.3.12) Synthesevorschriften | 195 |

| | |
|---|------------|
| 6.4) Experimente zur Zeitabhängigkeit von Reaktionen..... | 200 |
| 6.4.1) Sulfonat- und Thioester-vermittelter Transfer (UPLC™) | 200 |
| 6.4.2) Fluoreszenz-detektierte Transferexperimente (HPLC-FL/DAD)..... | 200 |
| 6.4.3) Strangverdrängungsexperimente am Fluoreszenzspektrometer | 201 |
| 6.4.4) Peptid-Strangverdrängungsexperimente über Fluoreszenzanisotropie | 203 |
| 6.5) Biochemische Methoden..... | 205 |
| 6.5.1) Zelllysis..... | 205 |
| 6.5.2) Gelelektrophorese..... | 205 |
| 6.5.3) Bradford-Assay | 206 |
| 6.5.4) Western Blot..... | 206 |
| 6.5.5) Immunofluoreszenz-Assay..... | 207 |
| 6.5.6) Dimerisierungsexperimente..... | 209 |
| 7) Anhang..... | 213 |
| 7.1) Abkürzungsverzeichnis | 213 |
| 7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik..... | 215 |
| 7.2.1) NMR-Analyse der Linker und Bausteine | 215 |
| 7.2.2) Massenspektrometrische und Chromatographische Analytik..... | 224 |
| 7.3) Anlagen zu biochemischen Methoden und ergänzende Messungen..... | 254 |
| 7.3.1) Vektorkarten..... | 254 |
| 7.3.2) Fluoreszenzmikroskopie..... | 255 |
| 7.3.3) Gelelektrophorese..... | 258 |
| 7.3.4) Western Blots | 259 |
| 7.3.5) Fluoreszenzspektroskopie | 261 |
| 7.4) Danksagung | 262 |
| 7.5) Literaturverzeichnis..... | 263 |

1) Einleitung

Die Signalweitergabe von Informationen aus dem extrazellulären Raum über Rezeptoren ist ein faszinierender Prozess von hoher Komplexität. Allein der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) besitzt sieben verschiedene Liganden, deren Bindung zu seiner Aktivierung führt. Diese verläuft entweder über Homodimerisierung zweier EGFR zu EGFR₂ oder Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren. Angenommen ein EGFR₂-Homodimer wird gebildet, so führen sieben kanonische Liganden zu 28 Kombinationsmöglichkeiten.^[1] Der EGFR ist allerdings auch in der Lage mit seinen verwandten Rezeptoren HER2, HER3 und HER4 zu interagieren, was das Netzwerk an kombinatorischen Möglichkeiten erweitert. Die Art der Ligandkombination und Rezeptordimerisierung hat einen Einfluss auf den darauf folgenden Schritt der Autophosphorylierung an einer von 20 verschiedenen Positionen im EGFR.^[2] Je nach Position werden andere Interaktionspartner, wie etwa Grb2, Cbl, PLCγ oder STAT3, im cytosolischen Teil rekrutiert und bestimmen, welche Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird. Im Ergebnis antwortet die Zelle durch Effekte wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Endozytose, Transkriptionsaktivierung oder Migration.^[3, 4] Betrachtet man das weitere Interaktom, so finden sich eine Reihe weiterer verstärkender oder negativer Rückkopplungsschleifen, die neben der Art, die Dauer der Effekte bestimmt.^[3, 5] Die Komplexität zellulärer Systeme wird umso deutlicher, wenn man sich vor Augen führt, dass eine Säugerzelle mit einer Gesamtanzahl von ca. $10^9 - 10^{10}$ Proteinen ausgestattet ist, die alle in ein vernetztes System eingebunden sind.^[6] Die Ordnung ist über strukturgebende Einheiten, wie Kompartimente, supramolekulare Verbände, Transportnetze, Lokalisation an Membranen und durch Vesikel gegeben.

Ein chemisches Analogon, welches diese Komplexität aufgreift und gesteuert ablaufen lässt ist in dem jungen Feld der Systemchemie zu finden.^[7] Zusammenhängende Prozesse werden kontrolliert miteinander verknüpft. Komplexe Abläufe können dabei auch durch strukturgebende Einheiten organisiert werden, was dann gezielte Reaktionen oder Funktionen ermöglicht, die unter anderen Bedingungen nicht ablaufen würden.^[8-15] Präzise Architekturen auf Basis von strukturierten Einzelbausteinen, wie die Zusammensetzung von Nukleotiden zu DNA-Strängen zu Nanoobjekten^[15-19] oder die Kombination von Aminosäuren zu Proteinen zu Proteinaggregaten^[20-24] erlaubt es, Gerüste mit neuen Funktionalitäten gezielt zu erzeugen.

Chemische Methoden der Markierung und Modulation der Proteinaktivität ermöglichen es, die Funktionsweise, Wechselwirkungen und Lokalisation einzelner Teilnehmer komplexer zellulärer Proteinnetzwerke zu erforschen. Gerade mit den Errungenschaften im Feld der hochauflösenden Mikroskopie sind Methoden, die kleine Fluorophore mit hoher Helligkeit

1) Einleitung

selektiv mit dem zu untersuchenden Protein verknüpfen, gefragt.^[25] Wird zudem die Organisation der Proteine durch artifizielle, chemische Konstrukte unter Kontrolle gebracht, können Rückschlüsse auf die Wirkweise gezogen werden und Effekte gezielt gesteuert werden. Hier können nukleinsäure- und peptidbasierte Organisationsstrukturen Anwendung finden.^[26-28] Sie werden als Plattform genutzt, um Wirkstoffe, Liganden und Interaktionspartner in definierten Strukturen zu präsentieren.^[9, 19, 24, 29-32] In der Summe bilden die gewonnen Erkenntnisse über die Funktionsweise proteinbiologischer Systeme und die Möglichkeit der chemischen Kontrolle über die Aktivität von Proteinen die Grundlage für neue therapeutische Agenzien etwa für die Behandlung von Erkrankung wie Krebs.^[33]

Diese Arbeit beschreibt neuartige Systeme auf Grundlage der strukturgebenden Einheiten PNA/DNA und Coiled-Coil-Peptiden, die die Markierung und Modulation von Proteinen ermöglichen.

2) Stand der Forschung

2.1) Proteinmarkierung und -modifikation

Die Untersuchung von Proteinen vor allem in ihrer natürlichen Umgebung ist herausfordernd, wie erstrebenswert. Zumeist ist eine Modifikation erforderlich, um das gewünschte Protein (*protein of interest*, POI) zu visualisieren, die Lokalisierung zu erforschen und die Interaktion des POI mit anderen Zellbestandteilen erkennbar zu machen. Die maßgebliche Schwierigkeit besteht darin, das eigentliche POI von der großen Menge weiterer Proteine, von ca. $10^9 - 10^{10}$ Proteinen je Säugerzelle, abzuheben.^[6] Die klassische Markierungsmethode durch Fusion mit einem fluoreszenten Protein (FP) kann allerdings die Proteinlokalisierung und -funktion abändern und ist demnach nicht immer anwendbar (Abb. 1).^[34-37] Kleinere Marker, die das native System nicht stören, sind daher wünschenswert. Gerade in dem sich entwickelnden Feld der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie sind kleine organische Farbstoffmoleküle mit hoher Photostabilität und Helligkeit gefragt.^[25, 38-40] Zur gezielten Installation von Markereinheiten auf Basis von chemischen Verknüpfungen muss entweder A) die Reaktion selektiv nur am Zielprotein möglich sein oder B) eine sonst unselektive Reaktion bevorzugt auf das Zielprotein gelenkt werden. Ersteres kann beispielsweise durch den Einbau unnatürlicher Aminosäuren (UAA, *unnatural amino acid*)^[41] in Kombination mit einer bioorthogonalen Reaktion erzielt werden.^[35, 42, 43] Hierunter werden Reaktionen verstanden, die unter milden, physiologischen Bedingungen selektiv ablaufen, ohne mit natürlichen funktionellen Gruppen zu reagieren. Die Staudinger-Ligation^[44], Azid-Alkin-Cycloadditionen^[45-47] oder Varianten der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf^[48] werden daher gern zur zellulären Proteinmarkierung genutzt. Proteine selbst verfügen ebenso über reaktive Einheiten wie z.B. die Seitenketten von Cystein oder Lysin, welche eine Reaktivität gegenüber Elektrophilen aufweisen. So können diese

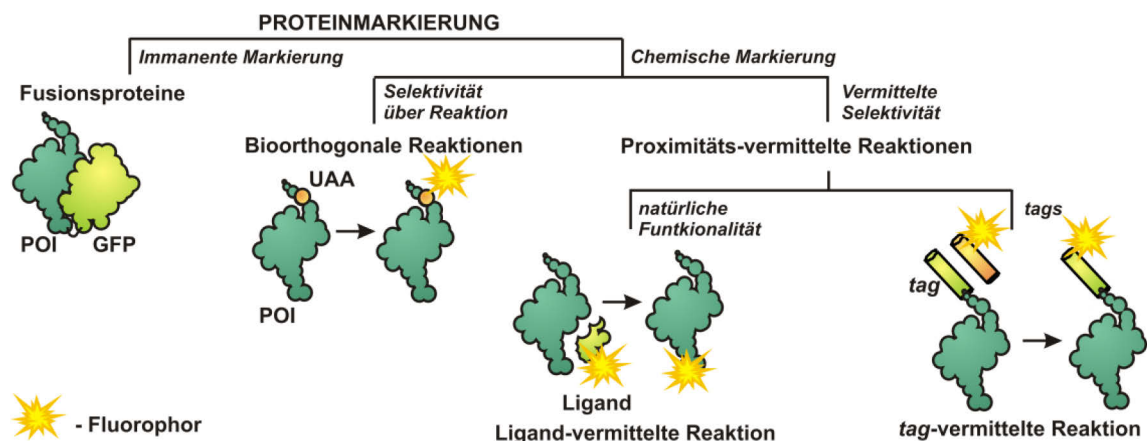


Abb. 1 Übersicht zu wesentlichen Proteinmarkierungskonzepten. Neben der permanenten fluoreszenten Markierung durch FPs kann nachträglich über UAAs, Liganden oder tags selektiv markiert werden.

2.1) Proteinmarkierung und -modifikation

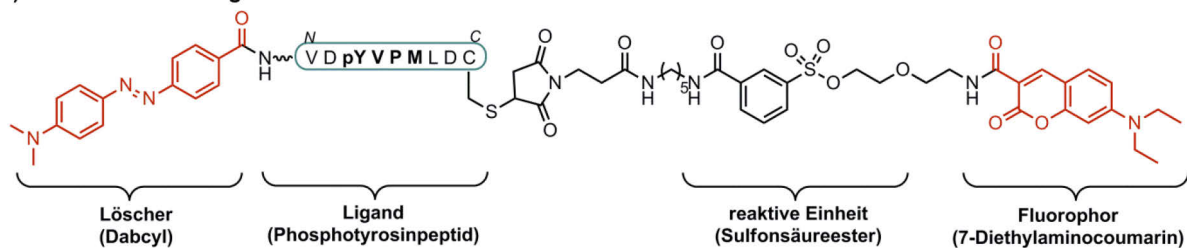
Aminosäuren zur Konjugation genutzt werden.^[49] Um unspezifischen Reaktionen zu begegnen, kann Selektivität durch Proximität erzeugt werden.^[8] Werden zwei potentielle Reaktanden vorab organisiert und durch intermolekulare Wechselwirkungen in räumliche Nähe gebracht, so kommt es zu einer Erhöhung der effektiven Molarität. In der Folge werden Reaktionen ermöglicht, die unter den gegebenen Konzentrationen sonst nicht bzw. nur langsam oder bei höheren Konzentrationen mit vielen Nebenreaktionen ablaufen würden. Proximität kann in proteinbiologischem Kontext hauptsächlich auf zwei Wegen erzielt werden: 1) durch die charakteristische, natürliche Funktion des Proteins oder 2) eine künstlich eingefügte molekulare Einheit – einen so genannten *tag*. Erstere Variante nutzt Moleküle, die eine Affinität gegenüber dem unmodifizierten Protein aufweisen: Antikörper^[13, 50-52], Pharmakophore^[53, 54], Aptamere^[55, 56] und artifizielle Liganden z.B. aus Phagen Display^[57] oder natürliche Liganden^[14, 58, 59]. Häufig genutzte chemische Reaktivitäten basieren dabei auf dem nukleophilen Angriff einer Aminosäureseitenkette über eine Substitutionsreaktion nach S_N^2 oder seltener S_NAr .^[60] Die Verknüpfung von Protein und Marker kann zudem durch entsprechendes Design mit einem Fluoreszenzanstieg einhergehen und damit den Hintergrund minimieren.^[61-63]

In der Kategorie der Ligand-gesteuerten Reaktionen soll hier das Beispiel der *ligand-directed tosylate chemistry* (LDT) hervorgehoben werden (Abb. 2).^[62, 64] Kern der Reaktion bilden Sulfonsäureester-Verbindungen, wie sie bereits vorher in aktivitätsbasierten Proteinstudien (*activity-based protein profiling*, ABPP) angewandt wurden.^[65, 66] In der Gruppe um Hamachi *et al.* wurden Liganden derart mit Sulfonsäureestern ausgestattet, dass sie zur gezielten Markierung von Proteinen in zellulärer Umgebung genutzt werden konnten. Dies soll am Beispiel der kovalenten Markierung der Src homology 2 (SH2)-Domäne einer PI3-Kinase in Abb. 2 kurz vorgestellt werden.^[62] Die Markierungssonde wird aus einem Löscher, dem Liganden, einem Abstandhalter, dem Sulfonsäureester und einem Fluorophor modular aufgebaut (Abb. 2A). Der natürliche Ligand ist ein Phosphotyrosin (pY)-haltiges Peptid mit dem Erkennungsmotiv pYVPM. Wird dieser Ligand vom Zielprotein gebunden, so reagiert die Sulfonsäureeinheit mit einem benachbarten Nukleophil, in diesem Fall einem Histidin und überträgt den Fluorophor in 30% Ausbeute auf das Protein. Zeitgleich wird die Nähe zwischen Fluorophor und Löscher gebrochen und die Fluoreszenz des markierten Proteins kann im Polyacrylamid-Gel (*sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) sichtbar gemacht werden. Zur Demonstration der zellulären Anwendbarkeit wurde das Zielprotein direkt in bakteriellem Zelllysat erfolgreich markiert. Es soll dennoch kritisch vermerkt werden, dass Reaktionszeiten von bis zu 44 h vergleichsweise lang für eine Markierungsmethode sind und ihre Anwendbarkeit in der zeitabhängigen Proteinuntersuchung einschränken. Ein Reaktionsbeschleunigung um Faktor zwölf konnte durch erhöhten Elektronenzug durch zusätzliche Halogene am Aromaten in *ortho*- und *para*-Position zum Sulfonsäureester erzielt werden.^[67] Weitere Anwendungen auf die α -Carboanhydrasen CA I und

2.1) Proteinmarkierung und -modifikation

CA II, das Protein FKBP12 und ein Protein aus der Familie der 14-3-3-Proteine, sowie die Modellproteine EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und MBP (*maltose binding protein*) folgten.^[62, 67-69] In weiteren Beispielen wurde über LDT der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Dehydrogenase, ortsspezifisch wahlweise mit einem Azid oder Alkin ausgestattet und über Click-Chemie weiter modifiziert oder LDT in der Selektion von Glykoproteinen im Mikrotiterplattenformat genutzt.^[70-72] Sulfonsäureester wurden zudem auch in der Oligonukleotid-gesteuerten Reaktionsführung angewandt.^[73] Hier nutzte die Gruppe um Kool *et al.* eine Kombination aus einem Fluorophor und Sulfonsäure-verknüpften Löschern, um die Anwesenheit komplementärer DNA oder RNA über einen Fluoreszenzanstieg zu detektieren.

A) Reaktive Markierungssonde



B) Tosylat-vermittelte Transferreaktion

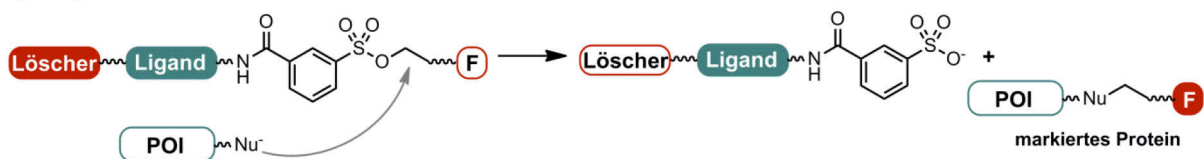


Abb. 2 *Ligand-Directed Tosylate Chemistry*: A) Markierungsmolekül aus selektiven und reaktiven Einheiten und dessen Reaktionsverlauf (B) in Anwesenheit des Ligand-bindenden POI.

Ist kein Bindungspartner bekannt, die Affinität zu gering oder eine Bindung an der gegebenen Stelle für weitere Untersuchungen hinderlich, so kann ein zusätzlicher *tag*, also eine ergänzende funktionale Sequenz über Klonierung in das Protein eingebracht werden. Häufig finden enzymaktive *tags* Anwendung,^[74] oder peptidische *tags*, die definierte Wechselwirkungen mit anderen Peptiden eingehen können.^[75] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sind vor allem peptidische *tags* auf Grundlage von Coiled-Coil-Peptiden (siehe Kapitel 2.2) von Interesse und sollen hier vorgestellt werden. Sie erzeugen Proximität und ermöglichen a) eine nicht-kovalente Markierung oder b) einen selektiven Reaktionsablauf. Beide Fälle sind anhand von Beispielen am Coiled-Coil-Peptidpaar K3/E3 in Abb. 3 dargestellt: A) interagieren Sequenz E3 und K3 miteinander, so befindet sich die am Peptid K3 installierte Markierung selektiv am Zielmolekül, z.B. dem Rezeptor EGFR, wie in der Gruppe um Matsuzaki *et al.* gezeigt werden konnte (Abb. 3A).^[76] Nachteil der nicht-kovalenten Markierung ist allerdings ihre geringe Stabilität gegenüber wechselnden Bedingungen, wie Internalisierung und Abbau, sowie die Größenzunahme des Gesamtmoleküls durch Anbringung einer weiteren Peptidkette. In der Gruppe von Seitz *et al.* wurde der Ansatz erweitert, indem die Peptid-Peptid-Interaktion zur Proximitätserzeugung für

2.1) Proteinmarkierung und -modifikation

eine selektive, kovalente Transferreaktion eines Fluorophors genutzt wurde.^[77] Die Transferreaktion zwischen einem Thioester und einem Cystein fand in Anlehnung an die native chemische Verknüpfung (*native chemical ligation*, NCL) statt.^[78] Diese Reaktion wurde über die Anwendung als Peptidligationsmethode hinaus in der Oligonukleotid- und Peptid-vermittelten Reaktionskontrolle bereits vielfach angewandt.^[11, 79-81] Hier wurde das E3-Peptid durch ein N-terminales Cystein ergänzt, während das K3-Peptid als Fluorophor-Donor fungierte, indem der Fluorophor durch eine reaktive Thioestereinheit verknüpft war (Abb. 3B).^[77] Das Cysteinthiol konnte nun nukleophil am Thioester angreifen und in einer Umesterung ein Gleichgewicht ausbilden, welches durch eine nachfolgende S→N-Acylumlagerung zur Bildung der unter zellulären Bedingungen stabilen Amidverknüpfung führte. Dies konnte in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Beck-Sickingen *et al.* an verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptor*, GPCR) an lebenden Zellen gezeigt werden und ermöglichte die Untersuchung dieser Rezeptoren.^[82] In anderen Beispielen wurde die kovalente Verknüpfung über Coiled-Coil-vermittelte Nähe durch die Reaktion zwischen Cystein und einer α -Chloracetyl-Einheit (Abb. 3C),^[83] Lysin und einem Carboxyl-Sulfonsuccinimidyl-Ester^[84] oder in einer metallkatalysierten Transferreaktion an einem zweikernigen Rhodiumkomplex gezeigt.^[85] Diese Beispiele veranschaulichen die hohe Selektivität und das Potential Peptid-vermittelter chemischer Reaktionen in der proteinbiologischen Anwendung.

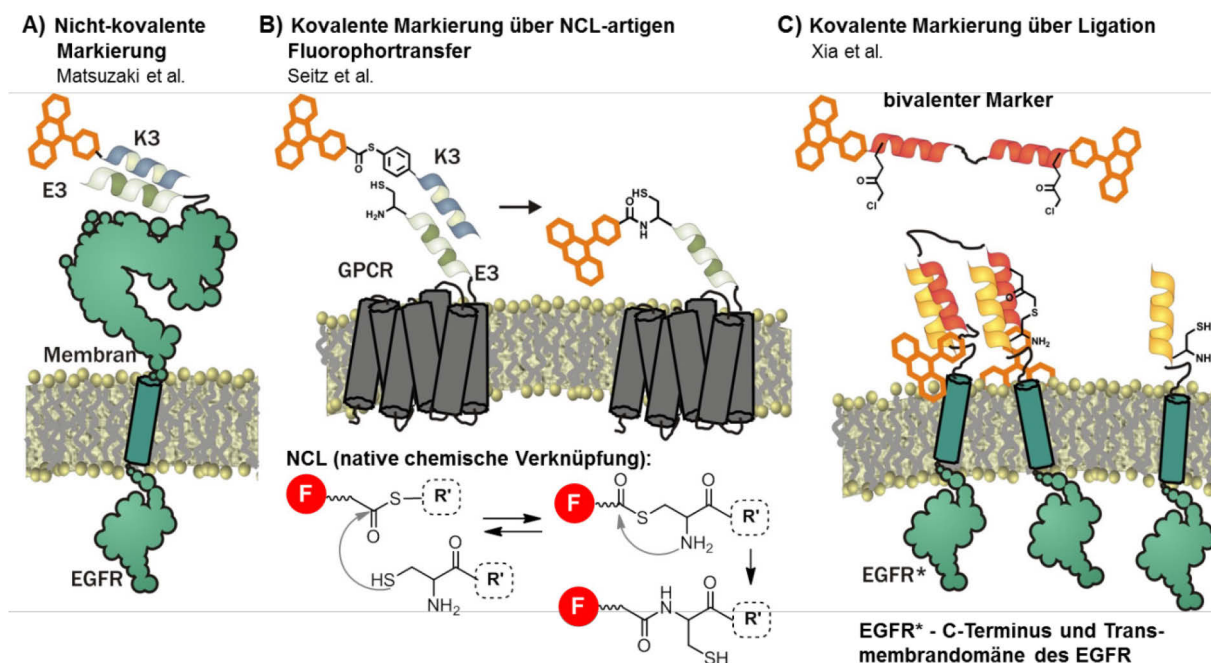


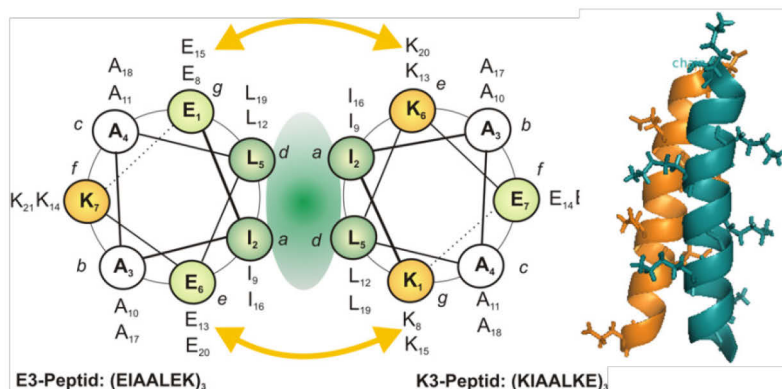
Abb. 3 Coiled-Coil-Peptidtag-vermittelte Proteinmarkierung. A) Wird das POI mit dem E3-Peptid als Fusionsprotein an der Zellmembran exprimiert, so kann das fluoreszent markierte K3-Peptid zur nicht-kovalenten Visualisierung des Proteins genutzt werden. B) Fluoreszent markierte K3-Thioester-Peptide führen über eine Transferreaktion zur kovalenten Markierung. Die Reaktion läuft ähnlich der NCL von Dawson, Muir, Clark-Lewis und Kent ab.^[78] C) Eine kovalente Markierung kann zudem durch die Ligation der Peptide E3 und K3 erreicht werden.

2.2) Coiled-Coil-Peptide zur Proteinmarkierung

2.2.1) Struktur von Coiled-Coil-Peptiden

Die in Abb. 3 dargestellten Beispiele basieren auf der Reaktionsvermittlung durch Coiled-Coil-Peptide. Unter Coiled-Coils versteht man Peptidpaare, die eine Affinität zueinander haben und sich unter Ausbildung einer definierten, α -helikalen Sekundärstruktur zusammenlagern. Im Fall kanonischer Coiled-Coil-Peptide weist jeder Peptidstrang eine rechtshändige Drehung mit 3.5 – 3.6 Aminosäuren Abstand je Drehung auf. Zwei solcher Stränge verdrillen sich wiederum linkshändig zu einem Supercoil (Abb. 4A).^[86] Solche Strukturen können parallel, wie antiparallel vorliegen; homo- oder heterodimerer Natur sein und neben di- auch tri- und tetramere oder noch höher geordnete Strukturen ausbilden.^[21, 87] Die Interaktionen zwischen den Peptiden sind hydrophober und elektrostatischer Natur und ergeben sich aus der Sequenzfolge.^[88] Diese besteht aus sich wiederholenden Heptaden mit klar definierten Positionen a-b-c-d-e-f-g, welche stark konserviert sind. Die Positionen a und d werden in der Regel von unpolaren, sterisch nicht anspruchsvollen Aminosäuren besetzt und bilden die hydrophobe Interaktionsfläche, die sich zwischen zwei Coiled-Coil-Peptiden ausbildet. Zusätzlich kommen die Positionen e und g benachbarter Coiled-Coils gegeneinander verschoben in räumliche Nähe und ermöglichen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen g_n und e_{n+1} . Komplementär geladene Seitenketten wie Glutaminsäure und Lysin sind vorrangig an diesen Positionen anzutreffen. Im Beispiel des Peptidpaares $(EIAALEK)_n / (KIAALKE)_n$ (E_n/K_n), wie es nach den Gestaltungsregeln nach Hodges *et al.* konstruiert wurde, sind diese Parameter erfüllt.^[89, 90] Für den Komplex der drei

A) K3/E3-Peptidpaar



B) Peptid-Origami

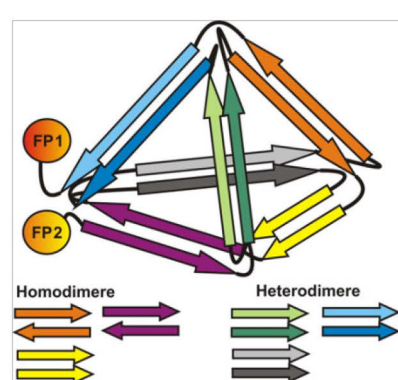


Abb. 4 Coiled-Coil-Strukturen. A) Das K3/E3-Peptidpaar in der Darstellung als Helixrad (links). Hydrophobe (grüne Fläche) und elektrostatische (orange Pfeile) Interaktionen sind farblich hervorgehoben. Die Nomenklatur a-b-c-d-e-f-g ist kursiv angegeben. In der dreidimensionalen Struktur aus NMR-Studien von Hodges und Sykes *et al.* ist die α -helikale Verdrillung und die seitliche Ausrichtung der entgegengesetzt geladenen Aminosäureseitenketten ersichtlich (rechts, RCSB PDB: 1u0i).^[91] B) Tetraedrische Struktur aus Coiled-Coil-Peptiden, welche zwei Teile eines fluoreszenten Proteins (FP1 und FP2) in räumliche Nähe bringt. Jedes Pfeilpaar stellt ein vier Heptaden langes Coiled-Coil-Paar dar.

2.2) Coiled-Coil-Peptide zur Proteinmarkierung

Heptaden langen Peptidpaare E3/K3 wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 64 \text{ nM}$ und für die Interaktion der Peptide E3/K4 der Wert von $K_D = 6 \text{ nM}$ bestimmt.^[76] Durch den gezielten Wechsel der Aminosäuren in bestimmten Positionen kann die Orientierung, Oligomerisierungsordnung und Affinität der Peptidpaare variiert werden.^[21, 86, 92] So können komplexe dreidimensionale Netzwerke^[93, 94], Röhren^[95-97] und metallorganische Gitter und Polymere^[98] gestaltet werden. In der Natur sind Coiled-Coil-Strukturen wichtige regulatorische Elemente für diverse zelluläre Prozesse und so können Coiled-Coils bis zu 10% des Proteoms eines Organismus ausmachen. Sie sind z.B. in Transkriptionsfaktoren, etwa in Form von Leucin-Zippern anzutreffen, wo sie die Bindung an DNA vermitteln.^[99, 100] Auch sind sie essentielle Bestandteile der Motorproteine Kinesin und Dynein und können durch Variation der Länge als strukturelle Platzhalter von bis zu $0.5 \text{ }\mu\text{m}$ fungieren.^[101] Coiled-Coils können das Gerüst für makromolekulare Komplexe bilden und in der Zell-Fusion durch so genannte SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) eine Rolle spielen.^[102]

Das Verständnis für die Prinzipien der Coiled-Coil-Wechselwirkungen wurde in den letzten Dekaden enorm erweitert und ermöglichte die *de novo*-Gestaltung von Coiled-Coil-Paaren.^[21, 86, 103-106] Grundlegend dafür sind Algorithmen, die die Stabilität simulierter oder aus Datenbanken extrahierter Strukturen z.B. als Schmelztemperatur T_M errechnen und daraus entstehende Paare ausgeben können.^[103, 105] Somit ist es möglich, Peptidpaare mit kontrollierten Affinitäten, Orientierungen, Oligomerisierungszuständen und allem voran Selektivitäten zu erzeugen.^[92, 107, 108] Peptidpaare mit kontrollierter Komplementarität A-A', B-B', C-C' usw. wurden generiert und angewandt.^[103, 104] Da die erzielten Peptide selektiv mit nur einem Bindungspartner, also A-A' und B-B', nicht jedoch untereinander also A-B' oder A-B-Dimere bildeten, kann hier von einer Orthogonalität gesprochen werden.^[104] Solche orthogonalen Peptidpaare eignen sich als „Bausteine“ bzw. „Tektone“ zur Gestaltung präziser, supramolekularer Architekturen.^[103]

2.2.2) Ausgewählte Anwendungen von Coiled-Coil-Peptiden als Strukturelemente

Analog der präzisen Steuerung, die sich im Aufbau von DNA-basierten Strukturen nach Origami-Technologie ergibt, können durch (orthogonale) Coiled-Coils peptid- und proteinbasierte Geometrien gezielt aufgebaut und durch solche Selbst-Assemblierung Nanostrukturen erzeugt werden.^[22, 24, 109] In einem eindrucksvollen Beispiel zeigten Gradišar *et al.* die Konstruktion eines Tetraeders mit ca. 5 nm Seitenlänge bestehend aus drei hetero- und drei homodimeren Coiled-Coils (Abb. 4B).^[110] Die korrekte Zusammensetzung der Form konnte sowohl in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gezeigt, als auch durch die rekonstituierte Fluoreszenz eines geteilten fluoreszenten Proteins nachgewiesen werden. Erst bei korrekter Sequenzfolge und Faltung ergab sich ein detektierbares Signal. Neben zahlreichen Coiled-Coil-

2.2) Coiled-Coil-Peptide zur Proteinmarkierung

basierten Architekturen wurden funktionale biomimetische Systeme^[111-113] aufgebaut, Lipidmembranen *in vivo* markiert,^[114, 115] die zielgerichtete Wirkstoffvermittlung ermöglicht^[116] und Reaktionen selektiv gesteuert.^[76, 77, 117, 118] Die erste Beschreibung einer Coiled-Coil-vermittelten Reaktionsbeschleunigung an Hand der nativen chemischen Ligation wurde 1996 von Ghadiri *et al.* gegeben.^[79, 80] Hier wurden die reaktiven Einheiten Thiol und Thioester flankierend an zwei Peptidsequenzen angebracht, die durch das komplementäre Coil-Peptid in räumlicher Nähe organisiert wurden. Als Grundlage dienten α -helikale GCN4-Peptide aus Leucin-Zipper-Domänen. Seitdem wurden Modifikationen^[82, 118, 119] und Ligationen^[83, 84] von Peptiden unter Coiled-Coil-Vermittlung vielfach demonstriert. Anwendungen im Bereich der Proteinmarkierung, vor allem an membranständigen Rezeptoren, stehen dabei im Vordergrund.^[28, 77, 82] Gerade artifizielle Coiled-Coil-Peptide werden bevorzugt in zellulärer Anwendung gewählt, da sie mit geringerer Wahrscheinlichkeit ungewünschte Interaktionen mit natürlichen Komponenten eingehen.

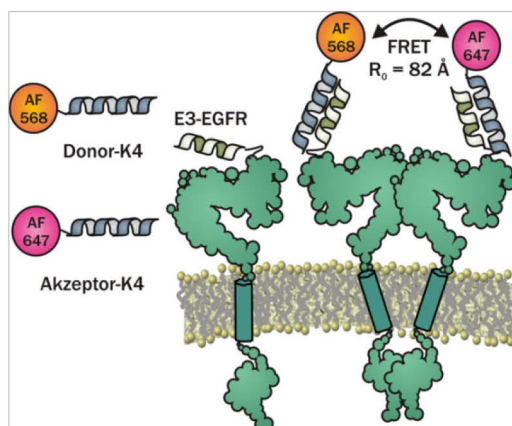
Zwei Beispiele, in welchen das Coiled-Coil Peptidpaar Kn/En genutzt wurde, um eine Proximität zu erzeugen sollen an dieser Stelle näher beleuchtet werden. Basierend auf der nicht-kovalenten Markierung von Rezeptoren durch Coiled-Coil-Peptide (Abb. 3A) entwickelte die Gruppe um Matsuzaki *et al.* eine Methode zum Auslesen des Oligomerisierungszustands von Transmembranproteinen auf lebenden Zellen. Am Beispiel des β_2 A-Rezeptors aus der Klasse der GPCRs etabliert,^[120] konnten sie später auch Rückschlüsse auf den Aktivierungsmechanismus des EGFR ziehen.^[121] Die Methodik selbst beruhte auf dem FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), also der strahlungslosen Übertragung von Energie, von einem Fluorophor (Donor) auf einen anderen (Akzeptor). Befinden sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe, so kommt es bei Anregung des Donors zur Emission durch den Akzeptor mit dessen spezifischer Emissionswellenlänge. Bei den gewählten Fluorophorpaaren konnten Abstände von bis zu 60 – 80 Å effizient detektiert werden. Für die Kombination von AlexaFluor568 (AF568) und AlexaFluor647 (AF647) beispielsweise beträgt der Försterradius, also der Abstand, in welchem die Effizienz des Energietransfers 50% beträgt, 82 Å. Eine EGFR-Mutante, die N-terminal mit der E3-Sequenz ausgestattet war, wurde mit einem Gemisch aus Donor- bzw. Akzeptor-tragendem K4-Peptid inkubiert (Abb. 5A). In Abhängigkeit von der Stöchiometrie an Donor- zu Akzeptorpeptid konnte nun mit steigendem Anteil an dimerisierten Rezeptoren ein stärkerer Energietransfer verzeichnet. Der Vergleich mit bekanntermaßen monomer und dimer vorliegenden Referenzproteinen verifiziert die Methode. Das Peptidpaar E3/K4 konnte somit genutzt werden, um den Anteil an EGFR-Dimeren in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen EGF direkt an der Oberfläche lebender Zellen auszulesen.

Gerade bei Rezeptoren mit medizinischer Relevanz ist neben dem Auslesen auch die Manipulation des Rezeptorverhaltens wünschenswert, um ein zielgerichtetes Eingreifen zu

2.2) Coiled-Coil-Peptide zur Proteinmarkierung

ermöglichen. Mit diesem Vorsatz entwickelte die Gruppe um Futaki *et al.* eine Erweiterung der E3-K4-vermittelten EGFR-Visualisierung. Die Coiled-Coil-Wechselwirkung wurde dabei genutzt, um eine Oligomerisierung herbeizuführen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine EGFR-Mutante, deren Ektodomäne durch Hämagglutinin (HA) und das E3-Peptid (E3-EGFR*) ersetzt wurde, durch eine bivalente Präsentation des K4-Peptids zur Dimerisierung gebracht werden konnte (ähnlich Xia *et al.* Abb. 3C).^[122] Dieses Konzept wurde weiter ausgebaut, um E3-EGFR* als Selektionsmerkmal für den intrazellulären Transport des Toxins Saporin zu nutzen (Abb. 5B).^[123] Hierbei wurden als Exosomen bezeichnete, extrazelluläre Transportvesikel im Inneren mit Saporin und außen mit K4-Peptiden ausgestattet. Die multivalente Präsentation des negativ geladenen Coiled-Coil-Peptids bewirkte ein Clustering der E3-EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was zur Internalisierung des Exosoms führte. Die intrazelluläre Degradation des Vesikels führte dann zur Freisetzung des Wirkstoffs. Die Coiled-Coil-Interaktion konnte in diesem Beispiel genutzt werden, um einen Wirkstofftransport in E3-EGFR-präsentierende Zellen zu ermöglichen. In Anbetracht der Relevanz des EGFR in der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen, könnte dies von medizinischem Nutzen sein.

A) Detektion von EGFR-Dimeren über FRET



B) Induziertes EGFR-Clustering durch multivalente K4-Exosomen

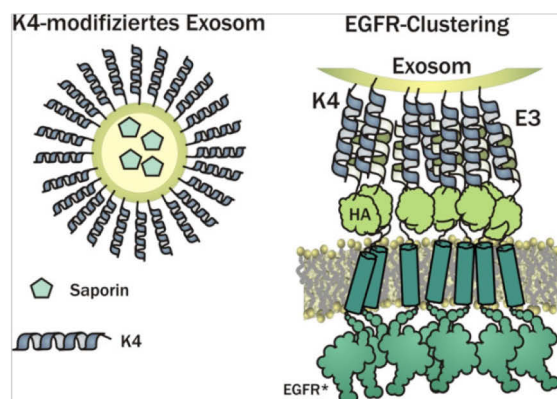


Abb. 5 Das E3-K4-Peptidpaar zur Visualisierung und Induktion der EGFR-Di- bzw. Oligomerisierung. A) Das E3-EGFR-Fusionsprotein bindet je ein modifiziertes K4-Peptid, entweder mit dem FRET-Donor AF568 oder mit dem FRET-Akzeptor AF647. Die räumliche Nähe zweier verschiedener Fluorophore in einem Dimer führt zu einer erhöhten Emission bei > 650 nm. Die Existenz von Dimeren auf der Zelloberfläche kann so durch die Intensität des Fluoreszenzsignals erkennbar gemacht werden.^[121] B) Exosomen wurden innen mit Saporin und außen mit dem K4-Peptid ausgestattet, sodass die multivalente Präsentation des K4-Peptids Clustering des artifiziellen E3-HA-EGFR* herbeiführte. Exosomen wurden anschließend internalisiert und der Wirkstoff Saporin freigesetzt.^[123]

2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR

2.3.1) Grundlagen der Rezeptoroligomerisierung

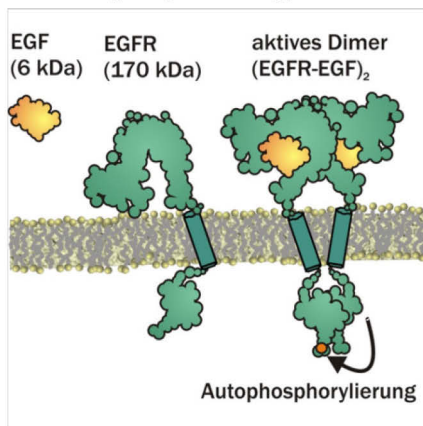
In den vorherigen Abschnitten wurde bereits auf Markierung und Anwendung durch Coiled-Coil-Peptide an einer bestimmten Proteinklasse eingegangen, den Rezeptoren. Dabei handelt es sich um Proteine an der Zelloberfläche, die Signale aus dem extrazellulären Raum aufnehmen, diese in eine korrespondierende Information für die Zelle umsetzen und ins Innere weiterleiten können.^[124] Als primäre Folge der Aktivierung von Rezeptoren werden Signaltransduktionskaskaden durch Rekrutierung weiterer Proteine eingeleitet oder inhibiert. Am Ende steht eine zelluläre Reaktion auf den Stimulus, welche beispielsweise die Hoch- oder Runterregulation von Expressionsraten weiterer Proteine sein kann.^[5] Zellen sind so in der Lage, auf ihre Umgebung zu reagieren, Zell-Zell-Kontakte zu ändern, zu wachsen, zu migrieren und Prozesse wie Differenzierung und Apoptose herbeizuführen. Zahlreiche membranständige Rezeptoren agieren durch Interaktion untereinander. Dabei bezeichnet Homodimerisierung den Prozess, in welchem zwei gleiche Rezeptoren miteinander wechselwirken, Heterodimerisierung das Zusammenspiel zweier verschiedener Rezeptoren. Höhere Oligomerisierungsformen wie Tetramere oder ganze „Cluster“ spielen ebenso vielfach eine Rolle.^[125] Die Dimerisierung stellt in erster Linie eine Proximitätserhöhung dar, die oft von einer konformationellen Reorganisation gefolgt wird, woraufhin Modifikationen wie etwa Phosphorylierungen eingeleitet werden. In verschiedenen Familien von Rezeptoren sind solche Oligomerisierungsmechanismen bekannt: G-Protein-gekoppelt Rezeptoren (GPCRs),^[126] Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs)^[127] und mehrkettige Rezeptoren der Immunantwort (*multichain immune response receptors*, MIRR) wie B- und T-Zell-Rezeptoren.^[10] Ein derartiges Zusammenspiel mehrerer Rezeptoren kann auch zwischen verschiedenen Rezeptorklassen auftreten. In der neuronalen Signaltransduktion beispielsweise, spielen Dimere aus Dopamin- und GABA-Rezeptor, also Heterodimere aus einem Ionenkanal und einem GPCR, eine Rolle.^[10] So erzeugt die Natur aus einer definierten Anzahl aus Elementen, hier Rezeptoren, ein kombinatorisches Netzwerk, welches diverse Antworten auf bereits kleine Veränderung geben kann.^[128] Hierbei spielt auch die Affinitätserhöhung durch Multivalenz oftmals eine Rolle.^[9, 10] Multivalente Verstärkung beschreibt im Wesentlichen die z.T. drastische Erhöhung der Bindungsstärke, wenn Ligand und / oder Rezeptor in mehreren Kopien präsentiert werden (siehe auch Beispiel in Abb. 5B). Je nach System spielen verschiedene Mechanismen, wie Chelatisierung, Clustering oder die statistische Rückbindung eine Rolle, die die thermodynamische (Enthalpie und Entropie) und kinetische (erhöhte effektive Molarität) Komponente des Bindungsereignisses beeinflussen (siehe Kapitel 4.7).^[9, 10] Proximität zwischen einzelnen Rezeptoren kann auch artifiziell durch so genannte CIDs (*chemical inducers of*

2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR

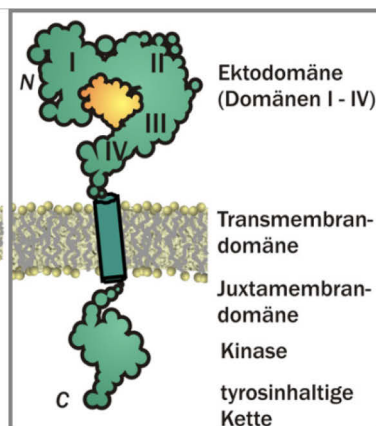
dimerization) erzeugt werden.^[129] Das prominenteste Beispiel für solche Dimerisierungsinduktoren ist das Protein FKBP, welches das kleine Molekül FK506 bindet. Generiert man nun ein Fusionsprotein mit FKBP, so wird dieses bei Zugabe der dimeren Variante von FK506, FK1012, zur Dimerisierung bewegt.

A) Aufbau und Aktivierung des EGFR

Aktivierung als (EGFR-EGF)₂-Dimer



EGFR-Domänen



B) Struktur der Ektodomänen mit EGF

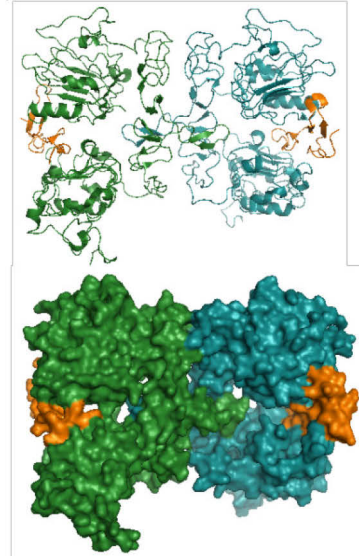


Abb. 6 Struktur und Aktivierung des EGFR. A) Schematische Darstellung der einzelnen Domänen (rechts): die extrazelluläre Domäne besteht aus Domänen I – IV, welche die Ligandbindung eingehen und die EGFR-Dimerisierung über Domäne II ermöglichen. Bei Aktivierung kommt es zur strukturellen Umorganisation der Transmembrandomäne und nachgelagerten Juxtamembrandomäne, welche die Aktivierung der Kinase bewirkt. Bei Aktivierung des Rezeptors in einem (EGFR-EGF)₂-Dimer phosphoryliert die Kinase eines EGFR die C-terminale Kette des anderen (links). B) Röntgenkristallstrukturen zweier EGFR-Ektodomänen (grün und blau) mit je einem EGF-Liganden als Tertiärstruktur (oben) und Oberflächenstruktur (unten). RCSB PDB: 1IVO.^[130]

2.3.2) Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor

Eine interessante Familie an membranständigen Proteinen sind RTKs, zu welchen unter anderem die Unterfamilien der ErbB-, Insulin- oder PDGF-Rezeptoren, sowie der Met-Rezeptor gehören.^[127] Strukturell ähneln sich die einzelnen Vertreter sehr: Sie verfügen N-terminal über extrazelluläre Liganden-Bindungsdomänen, eine helikale Transmembranregion und einen C-terminalen im Cytosol befindlichen Teil, welcher die Juxtamembran- und die Kinasedomäne, sowie eine C-terminalen Kette trägt.^[131] Eine RTK, welche in der letzten Dekade zunehmend in den Fokus der Forschung rückte, ist der ca. 170 kDa große epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor, EGFR (Abb. 6).^[132, 133] Bei Bindung eines Liganden zwischen Domäne I und III, etwa des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), wird der Rezeptor über asymmetrische Homodimerisierung aktiviert und kann zelluläre Prozesse wie Motilität, Proliferation und Apoptose einleiten.^[3, 134] Die Interaktion zwischen zwei EGFR erfolgt zunächst am extrazellulären Dimerisierungsarm (Domäne II) und bewirkt eine konformationelle

2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR

Umstrukturierung, welche auch die Transmembranregion und den intrazellulären Teil betrifft und die Phosphorylierung eines Rezeptors durch die Kinasedomäne des anderen bewirkt.^[131, 135] Die EGFR-Unterfamilie besteht aus vier Vertretern, welche auch als ErbB1 – ErbB4 oder HER1 – HER4 durchnummeriert werden, wobei im Allgemein nur der ErbB1 / HER1 als der EGFR bezeichnet wird. Die einzelnen Rezeptoren interagieren auch untereinander durch Bildung von Heterodimeren. So ist etwa für HER2 kein kanonischer Ligand bekannt, sodass dessen Aktivierung beispielsweise über Bindung des EGFR vermittelt wird.^[127]

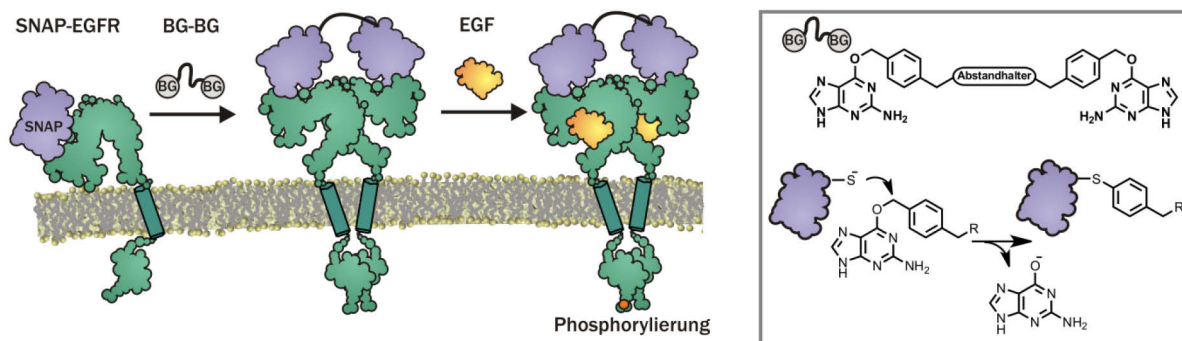
Der EGFR ist ein wichtiger Tumormarker, da diverse Krebsarten, wie nicht-kleinzelliger Lungenkrebs und Brustkrebs, die Expression des Rezeptors heraufregulieren und damit verstärktes Zellwachstum induzieren.^[1, 134] Einige zugelassene Therapeutika auf Basis von Antikörpern (Cetuximab, Panitumumab) oder kleine Moleküle als Inhibitoren (Gefitinib) adressieren den EGFR oder seinen verwandten Rezeptor HER2 (Trastuzumab). Gerade in diesem Kontext ist das detaillierte Verständnis des Aktivierungsmechanismus' des EGFR fundamental. Zwar ist allgemein akzeptiert, dass sich EGF-Rezeptoren durch EGF-Stimulation in zumindest dimerer Form zusammenlagern und die gegenseitige Phosphorylierung an Tyrosin im C-terminalen Teil des Rezeptors eine Aktivierung bewirkt, doch sind noch zahlreiche Fragen unklar: Wie können kanzerogene Mutanten, ohne EGF-Bindungsstelle aktiviert / deaktiviert werden? Welche Rolle spielt die Anwesenheit weiterer Liganden wie TGF α oder Epiregulin? Erfolgt die Bindung der Liganden sequenziell oder konzertiert? Können EGFR-Dimere in Abwesenheit von Liganden aktiviert werden, also die Autoinhibition anderweitig umgangen werden? Welche Rolle spielen höher geordnete EGFR-Oligomere und Cluster, welche mehrfach gefunden wurden?^[136] Eine Vertiefung der biologischen Zusammenhänge soll in Kapitel 4.3 gegeben werden und an dieser Stelle lediglich zwei konzeptionelle Beispiele gezeigt werden, wie die Rezeptordimerisierung Ligand-unabhängig induziert werden kann.

Sun *et al.* nutzten ein Fusionsprotein aus EGFR und N-terminal installiertem SNAP-tag zunächst zur Markierung des Rezeptors.^[137] Später demonstrierten sie anhand des SNAP-EGFR, wie durch Zugabe des SNAP-Liganden Benzylguanin (BG) in bivalenter Form (BG-BG) eine kovalente Verbrückung zweier Rezeptoren erreicht werden konnte (Abb. 7A).^[138] Über Western Blot-Analyse zeigten sie, dass das Vorliegen von Dimeren allein nur eine geringe basale Phosphorylierung aufwies. Erst die Stimulation mit 20 nM EGF führte zu einem deutlich erhöhten Anteil an phosphoryliertem Rezeptor (pEGFR) und ist demnach kennzeichnend für eine Aktivierung. Zwar hat die zusätzliche SNAP-Domäne den Vorteil, dass die Verbrückung ohne Besetzung der EGF-Bindungstasche erfolgen kann, allerdings stellt der SNAP-tag mit 20 kDa eine ähnlich große Modifikation wie die eingangs erwähnten fluoreszenten Proteine von ca. 25 kDa dar.^[36, 75]

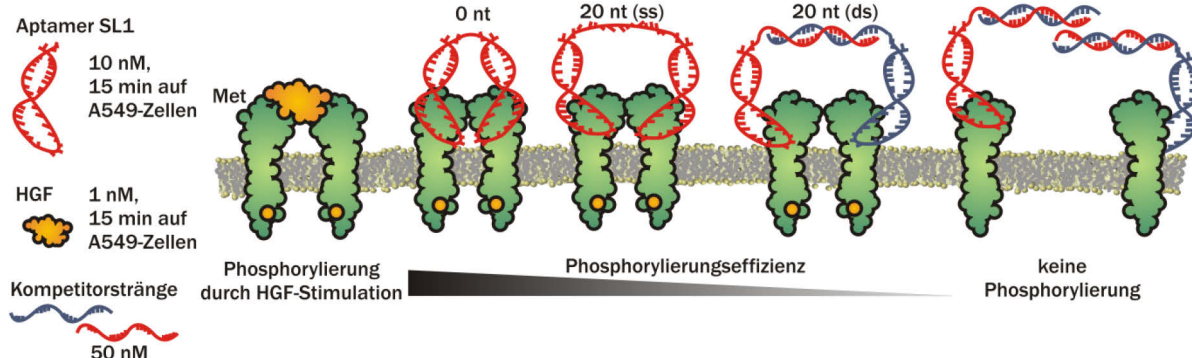
2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR

Ohne Einführung zusätzlicher Modifikationen kommt die Aptamer-basierte Strategie aus, die in der Gruppe um Sando *et al.* entwickelt wurde. Aptamere sind Oligonukleotidsequenzen mit selektiver Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül. Meist werden Aptamere aus Bibliotheken mit Selektionsverfahren wie SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) gewonnen und können Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich erreichen.^[139] Die Gruppe nutzte das 50-Nukleotid-lange DNA-Aptamer SL1, welches selektiv den Met-Rezeptor bindet (Abb. 7B).^[140] Diese RTK wird normalerweise durch den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) aktiviert, indem zwei Met-Rezeptoren ein HGF-Molekül binden. Die HGF-induzierte Proximität

A) EGFR-Dimerisierung über SNAP-tag



B) Dimerisierung und Aktivierung des Met-Rezeptors durch bivalente Aptamere



C) Rezeptor-Umprogrammierung durch kombinierte Aptamere

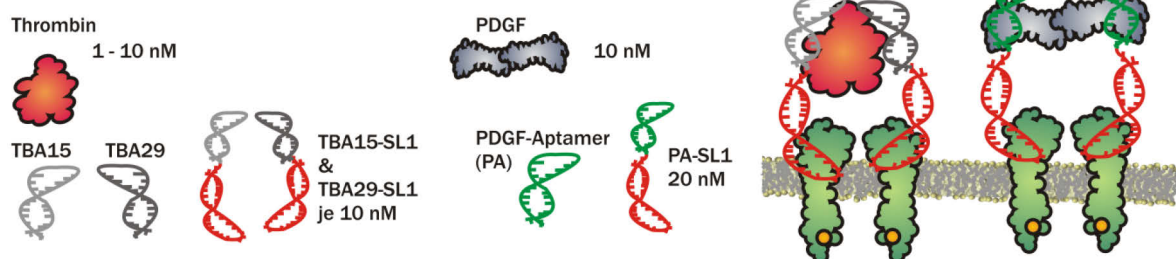


Abb. 7 Beispiele zur gezielt induzierten Dimerisierung der RTK EGFR und Met. A) Über Anbringung eines SNAP-tags an den EGFR und Verwendung des bivalenten Liganden BG-BG konnten zwei EGFR-Moleküle kovalent verbrückt werden. Durch die intrinsische Autoinhibition des Rezeptors, war die Gabe von EGF dennoch erforderlich, um die Phosphorylierung einzuleiten. B & C) Aktivierung des Met-Rezeptors durch kontrollierte Verbrückung durch bivalente Aptamere SL1. B) Wird SL1 direkt in dimerer Form appliziert, so ist die resultierende Phosphorylierung abhängig von der Entfernung und Rigidität der Aptamere. Ist die Verbrückung der Aptamere durch Zugabe von Kompetitorsträngen inhibiert, wird keine Rezeptoraktivierung verzeichnet. C) Durch Kombination von SL1 mit Aptameren für andere Stimulatoren wie Thrombin und PDGF kann die Met-Aktivierung bezogen auf eben diese Stimulatoren erreicht werden.

2.3) Rezeptordimerisierung und der EGFR

zweier Rezeptoren bewirkt die Aktivierung und damit die gegenseitige Phosphorylierung sowie nachgelagerte Prozesse wie Proliferation. Durch Anordnung zweier SL1-Einheiten in einem Dimer konnte eine künstliche Verbrückung zweier Met-Rezeptoren erzielt werden. Dabei zeigte sich, dass kurze Abstände von 0 Nukleotiden (nt) eine höhere Phosphorylierung erreichen als lange Abstände von 10 – 20 nt und dass eine Rigidifizierung der verbrückenden Sequenz durch Vorliegen im Doppelstrang geringere relative Phosphorylierung bewirkte, als der gleichlange Einzelstrang. Zudem wurde demonstriert, dass bereits 0.5 – 5 nM SL1-Dimer eine ähnliche gesteigerte Proliferation an HUVEC-Zellen induzierte, wie 1 nM HGF. In einer Folgestudie wurde gezeigt, wie Aptamer-basierte Rezeptordimerisierung derart umprogrammiert werden kann, dass der gewählte Rezeptor durch einen anderen Stimulus, als den nativen Liganden angesteuert werden kann (Abb. 7C).^[141] Zum einen konnten monovalente Stimuli wie Thrombin genutzt werden, wenn SL1-Hybride mit den Thrombin-Aptameren TBA15 und TBA29 generiert wurden. TBA15 und TBA29 binden Thrombin an unterschiedlichen Bindungsstellen, sodass ein einzelnes Thrombinmolekül die Verbrückung der SL1-Einheiten und damit zweier Met-Rezeptoren bewirkt. Zum anderen wurde der Wachstumsfaktor PDGF als Stimulus genutzt, der in dimerer Form in Entzündungsprozessen vermehrt ausgestoßen wird. Die Verknüpfung von SL1 und dem PDGF-Aptamer sensitivierte den Met-Rezeptor für die Gabe von 10 nM PDGF und führte zu dessen Phosphorylierung. Bivalente, cyclische Aptamere zeigten zudem eine erhöhte Stabilität in *in vivo*-Anwendungen zur Tumordiagnostik.^[142] Diese Beispiele zeigen eindrucksvoll, wie Rezeptordimerisierung gesteuert und umprogrammiert werden kann und wie Oligonukleotide als Werkzeug zur Proteinmanipulation genutzt werden können.

2.4) PNA-DNA- und DNA-DNA-Interaktionen in der proteinbiologischen Anwendung

2.4.1) Strukturelle Merkmale von PNA-DNA- und DNA-DNA-Doppelsträngen

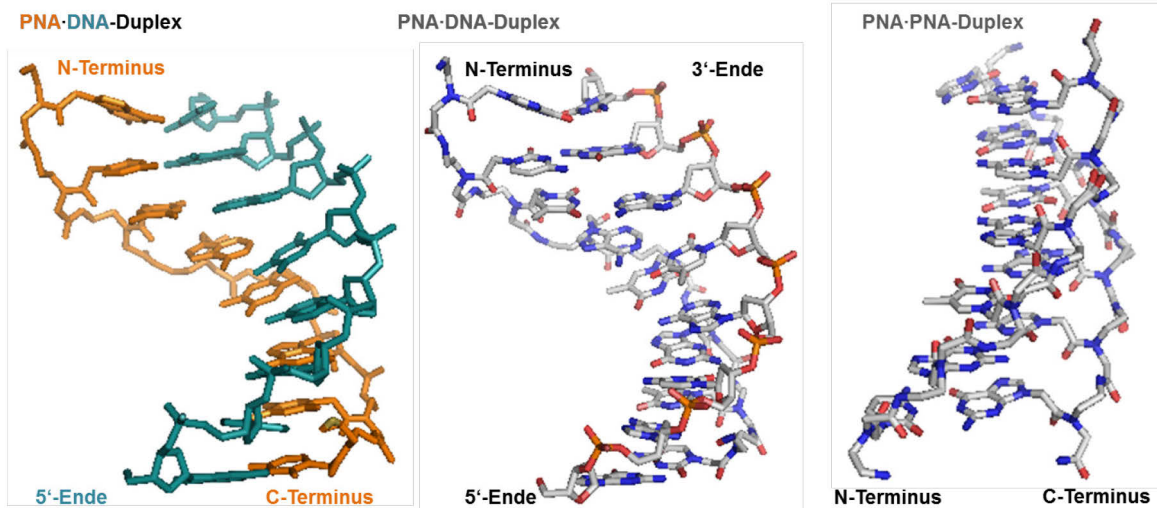
Neben Proteinen, Lipiden und Zuckern bilden Oligonukleotide eine der wesentlichen Biomolekülklassen zum Aufbau von Organismen. In der Natur treten sie in Form von DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) auf, doch gibt es auch diverse artifizielle Analoga wie LNA (*locked nucleic acid*)^[143, 144] oder TNA (*threose nucleic acid*), welche unter dem Begriff XNA (Xenonukleinsäure) zusammengefasst werden.^[145] Das wohl bemerkenswerteste DNA-Analogon ist die Peptidnukleinsäure PNA (*peptide nucleic acid*), welche sich strukturell von der DNA durch ein peptidisches Rückgrat unterscheidet (Abb. 8C). Sie wurde 1991 von Nielsen, Egholm, Berg und Buchard als achirale Polyamidkette vorgestellt, die mit Thymin-Nukleobasen ausgestattet an einen komplementären DNA-Doppelstrang binden kann.^[146-149] Die PNA verfügt über einige interessante Eigenschaften. Neben dem selektiven Bindungsverhalten über

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

A) Strukturelle Kennzahlen zu DNA·DNA- PNA·DNA-Duplex

| DNA·DNA-Duplex | | PNA·DNA-Duplex | |
|-------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|
| Ganghöhe: | 33.2 Å | Ganghöhe: | 42 Å |
| Durchmesser: | 20 Å | Durchmesser: | 23 Å |
| Nukleobasen je Windung: | 10.5 | Nukleobasen je Windung: | 13 |
| Drehung je Nukleobase: | 34° | Drehung je Nukleobase: | 28° |
| Abstand je Nukleobase: | 3.32 Å | Abstand je Nukleobase: | 3.23 Å |
| Form: | B | Form: | Mischung aus A und B |
| Richtung: | rechtsgängig | Richtung: | rechtsgängig |

B) Strukturen von PNA·DNA- PNA·PNA-Duplex



C) Chemische Strukturen von DNA und PNA

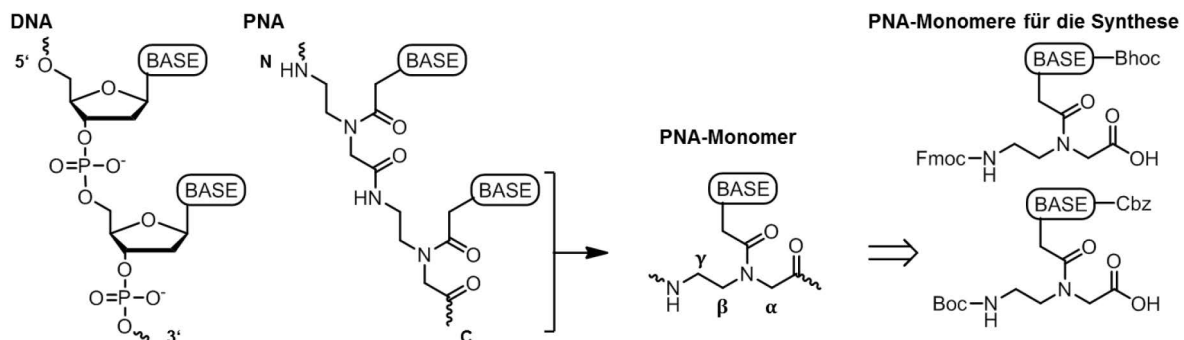


Abb. 8 DNA- und PNA-Strukturen. A) Unterschiede in der räumlichen Struktur von DNA·DNA- und PNA·DNA-Doppelsträngen. B) Struktur eines PNA·DNA-Duplex (links – farbliche Unterscheidung zwischen PNA (orange) und DNA (grün); mittig – farbliche Kennzeichnung nach Atomen) aus NMR-Studien (RCSB PDB: 1PBDT)^[150] und eines PNA·PNA-Duplex (rechts) aus Röntgenkristalluntersuchungen (RCSB PDB: 1PUP)^[151]. Bhoc – Benzhydryloxycarbonyl, Cbz – Benzyloxycarbonyl.

Watson-Crick-Basenpaarung an DNA wie auch RNA, verfügen PNA-basierte Doppelstränge über eine höhere thermische Stabilität als ihre DNA- bzw. RNA-Analoga. An einem PNA-Oligomer mit der Sequenz H-GTAGATCACT-NH₂ (Nomenklatur analog zu Proteinen und Peptiden: N → C) konnten für die Bindung an komplementäre PNA- oder DNA-Stränge folgende Stabilitäten ermittelt werden: PNA·PNA_{antiparallel} (67 °C) > PNA·DNA (51 °C) > PNA·PNA_{parallel} (47 °C) > DNA·DNA (33.5 °C).^[152] Beispielhaft sind die Strukturen für den antiparallelen PNA·PNA-Doppelstrang (N-Terminus von Strang A an C-Terminus von A') und PNA·DNA-Doppelstrang (N-Terminus an 3'-Ende) in Abb. 8B reproduziert. Im Gegensatz zum DNA-Duplex in der üblichen B-

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

Form liegt der PNA·DNA-Duplex in einer weiteren und gestreckteren Form vor (Abb. 8A).^[150] Die höhere thermische Stabilität und geringere Sensibilität gegenüber Veränderungen in Salzkonzentrationen resultieren aus dem ungeladenen Rückgrat der PNA.^[153] Diese artifizielle Struktur bewirkt zudem eine Stabilität gegenüber Nukleasen. Allerdings ist auch eine hohe Hydrophobizität der PNA eine Folge des ungeladenen Charakters, was bei höheren Konzentrationen zu Aggregation führen kann. Dem kann durch Einführung weiterer Modifikationen entgegengewirkt werden. Da die PNA über Peptid-Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) synthetisch leicht zugänglich ist, können Modifikationen über zweierlei Wege einfach eingebaut werden: A) es werden zusätzliche geladenen Aminosäuren wie Lysin oder Asparaginsäure im Verlauf der SPPS an N- und C-Terminus ergänzt oder B) Modifikationen werden direkt im PNA-Monomer am Rückgrat in α -, β - oder γ -Position eingebaut (Monomer in Abb. 8C).^[154]

2.4.2) DNA- / PNA-basierte Methoden in der Proteinbiologie

Die zentrale Rolle der DNA / RNA in einem Organismus, sowie die chemischen Eigenschaften der kontrollierten Assemblierung in geordneten Strukturen erlauben ein breites Anwendungsspektrum von Oligonukleotiden über die chemische Biologie, Medizin und Materialwissenschaft hinaus. Hier soll nur jener Teilaspekt Oligonukleotid-basierter Systeme beleuchtet werden, der PNA- und DNA-Gerüste in der Untersuchung und Manipulation von Proteinen mit Ausrichtung auf die Anwendung in zellulärer Umgebung umfasst.

Präsentation von Liganden an PNA·DNA-Gerüsten

Wird ein kleines Molekül – z.B. ein Ligand, Effektor oder eine Reportereinheit – mit einem Oligonukleotid verknüpft, so kann durch die Hybridisierung dieses Oligonukleotidstrangs an einem längeren Strang, im Folgenden Templatstrang genannt, die räumliche Positionierung mehrerer kleiner Moleküle zu einander bestimmt werden.^[19, 32] Die Anzahl, Art und Abstände der einzelnen Moleküle kann durch die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des gebildeten Duplex' gezielt eingestellt werden. In einem ersten Beispiel demonstrierte die Gruppe um Kobayashi *et al.* die Assemblierung von Galaktose-Clustern durch die Anlagerung Galaktose-modifizierter DNA-20mere an einen längeren Templatstrang.^[155] Seitdem wurde in zahlreichen analogen Anwendungen die Generierung multivalenter Systeme an DNA·DNA-Konstrukten gezeigt und funktionale Systeme geschaffen.^[9, 32] Neben Chromophoren^[156], Sacchariden^[157] und

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

organischen Molekülen^[158, 159] können auch peptidische Liganden^[160, 161] mit DNA verknüpft werden. Eberhardt *et al.* etwa nutzten DNA-Gerüste, um die phosphotyrosinhaltige SH2-Erkennungssequenz KpYETLG in Abständen von 2 – 21 Nukleobasen bivalent zu organisieren (Abb. 9A, Seite 22).^[162] Die Affinität der Tandem-SH2-Domäne aus Syk zum bivalenten Liganden konnte damit direkt in Lösung bestimmt werden. Die Fähigkeit der Proteindomäne sich verschiedenen Ligandenabständen zu einem bestimmten Maße anzupassen konnte gezeigt und eine Grenze bei einer Distanz von 12 – 13 Nukleotiden (ca. 41 – 44 Å) ermittelt werden. Die Flexibilität zwischen den Liganden selbst kann allgemein durch die Wahl der Abstandhalter zwischen Molekül und Strang oder durch die Hybridisierung des Templates nach Bedarf moduliert werden. Wird etwa ein Templatesegment als Einzelstrang beibehalten, so hat das erzeugte Konstrukt freie Bewegung im Raum. Liegt der Templatestrang komplett als Duplex vor, so kann er als rigider Stab mit einer Persistenzlänge von ca. 50 nm (150 Basenpaare) angenommen werden. Marczyne *et al.* zeigten des Weiteren, dass peptidtragende DNA-Gerüste genutzt werden können, um die Parameter zu ermitteln, die die Selektivität von bivalenten Liganden gegenüber verschiedenen SH2-Proteinen definieren.^[163]

Die Verwendung von PNA- anstelle von DNA-Strängen zur Konjugation mit dem zu präsentierenden Molekül kann mehrere Vorteile mit sich bringen. Da mit kürzeren Sequenzen höhere Duplexstabilitäten erreicht werden können, sind kleinere Abstände zwischen den Liganden möglich. Unter der Annahme, dass im Fall von PNA ca. 8 nt und für DNA ca. 15 nt benötigt werden, um eine ausreichende Duplexstabilität bei Raumtemperatur zu erzielen,^[19] sind 27 Å Abstand durch ein PNA·DNA-System zugänglich, während ein reines DNA·DNA-Gerüst Liganden-abstände erst ab 48 Å erlaubt. Zudem können PNA-Bausteine synthetisch leicht an der α -, β - oder γ -Position modifiziert werden und damit Liganden an einer beliebigen Stelle angebracht werden. So wurden PNA-Oligomere mit Mono-^[157, 164], Di-^[165] und Oligosacchariden^[166, 167] ausgestattet, mit aktiven Peptiden^[168, 169], Aptameren^[166], mit organischen Molekülen^[170, 171] dekoriert und an DNA-Strukturen präsentiert. Im Ergebnis können Affinität und Selektivität der Bindungspartner für Proteine verbessert und kontrolliert werden und damit die Proteinaktivität beeinflusst werden.^[26] Auch lässt sich die räumliche Organisation von Proteinen abfragen, wie etwa Abstände zwischen Bindungsdomänen oder der Oligomerisierungszustand von Proteinen und Proteinverbänden. Die Gruppe um Appella *et al.* nutzte etwa PNA-Ligand-Konjugate, um sie in verschiedenen Abständen und Mengen dem membranständigen GPCR A_{2A} zu präsentieren (Abb. 9B, Seite 22).^[170] Optimal angeordnete bivalente Konjugate erreichten Affinitäten von 26 nM gegenüber dem monovalenten Liganden mit 1075 nM, was die bestehende Theorie der Rezeptorhomodimerisierung untermauert.

Organisation von Proteinen an Oligonukleotidgerüsten

Neben Peptiden und kleinen Molekülen können auch ganze Proteine oder Proteinfragmente an DNA-Templatsträngen organisiert werden.^[26, 32] Werden etwa zwei Teilproteine an einem DNA-Strang zur Komplettierung gebracht, kann gezielt ein fluoreszentes Signal^[172] erzeugt oder eine Reaktion^[173] ermöglicht werden (Abb. 9C). Die Anordnung von ganzen Enzymen in räumlicher Nähe wurde genutzt um Katalysekaskaden zu steuern.^[174-177] So können gesamte Multi-enzymkomplexe durch die Organisation von Protein-DNA-Konjugaten an DNA-Architekturen konstruiert werden.^[17, 177] Neben DNA-Einzelsträngen als Template für lineare Anordnungen von Proteinen revolutionierte die Origamitechnologie zur kontrollierten Assemblierung definierter dreidimensionaler DNA-Strukturen das Spektrum der Architekturen zur Protein-DNA-Immobilisierung.^[18, 178-180] Die supramolekulare Organisation von Proteinen an komplexen DNA-Gerüsten wurde seitdem genutzt, um Reaktionen zu steuern (Abb. 9E),^[181, 182] Rezeptoren zu aktivieren,^[183] Proteinaktivität schaltbar zu machen,^[184, 185] Hybridmaterialien^[186] und Protein-funktionalisierte Oberflächen^[187] zu erzeugen und biologische Systeme zu imitieren.^[188, 189] Die Simulation etwa des eukaryotischen Motorproteinsystems gelangt Derr *et al.* anhand eines DNA-basierten „Gestells“, welches mit den verschiedenen Anzahlen und Anteilen der Proteine Dynein und Kinesin ausgestattet wurde (Abb. 9K).^[188] Das Gestell selbst bestand aus 12 DNA-Helices, die zu einem 225 nm langen Stab assembliert wurden. Wurde das Gestell mit Dynein versehen, so konnte eine Bewegung des Protein-DNA-Komplexes entlang von Mikrotubulinstrukturen in eine definierte Richtung beobachtet werden. Mit Kinesin ausgestattete Gestelle bewegten sich in die entgegengesetzte Richtung. In beiden Fällen führte eine höhere Anzahl an Motorproteinen nicht zu einer Beschleunigung, aber zu einer Verlängerung der zurückgelegten Strecke. Wurden beide Proteine an ein und dasselbe DNA-Gestell angebracht, so kam zu einer Art „Tauziehen“, wobei der Anteil an Dynein bzw. Kinesin die Richtung bzw. den Anteil an unbewegten Gestellen vorgab.

Die Anwendung von PNA in komplexen Oligonukleotidarchitekturen zur Proteinpräsentation wurde bislang seltener vorgenommen. Im Gegensatz zu PNA- ist die DNA-basierte Origamitechnologie weitläufig etabliert und auch die benötigten kurzen DNA-Stränge sind preiswerter kommerziell erhältlich. Weiter verbreitet ist die Anwendung von PNA-basierten Systemen in Arrays / Bibliotheken.^[190] Dennoch wurden PNA-Protein-Konjugate sowohl linear an DNA-Strängen^[191] als auch in komplexeren tetraedrischen Geometrien generiert.^[192] In letzterem Fall konnten durch die Verwendung von PNA die Seitenlängen eines DNA-Tetraeders kurz gehalten werden, da kürzere PNA-Sequenzen (8 nt) eine ausreichende Stabilität boten, als vergleichbare DNA-Stränge. Kazane *et al.* demonstrierten den Gebrauch von PNA-Protein-Konjugaten an DNA-Gerüsten zur Generierung Homo- und Heterodimerer Antikörperfragment (Abb. 9H).^[193] Über den Einbau einer unnatürlichen Aminosäure stellten sie Konjugate aus Fab-Fragmenten gegen

die RTK HER2 und den T-Zell-Rezeptor CD3 mit 12mer-PNA-Sequenzen her. Die di- und tetramere Organisation von anti-HER2-Fab-Fragmenten steigerte die HER2-Phosphorylierung im Vergleich zum monomeren Fragment. Die tetramere Variante bewirkte sogar eine höhere Aktivität des Rezeptors als durch Inkubation mit dem vollständigen IgG-Antikörper. Bispezifische Antikörper treten zunehmend in den Fokus der Forschung, da sie vielversprechende Tumortheraeutika darstellen, die speziell gegen erkrankte Zellen wirken sollen.^[194] Durch die PNA-Kontrolle konnten anti-HER2- / anti-CD3-bifunktionale Antikörpermimetika hergestellt werden, welche CD3-tragende T-Lymphozyten selektiv zu HER2-exprimierenden Tumorzellen rekrutierten. Der Vorteil der PNA-Konjugation im Vergleich zur gentechnologischen Herstellung bivalenter Antikörper liegt nun darin, dass die Positionierung der Fragmente zu einander, sowie die Art der Fab leichter variiert werden kann als durch eine jeweils erneute Herstellung ganzer Antikörpermutanten. Dieckgießer *et al.* nutzen anstelle des Fab- den fluoreszent markierten Fc-Teil eines Antikörpers, um über PNA-Konjugation ein Aptamer zu binden.^[195] Anstelle des Fab-Fragments steuerte nun das Aptamer die Selektivität. Auch die direkte Konjugation mit einem Wirkstoff als gerichtetes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat wurde über PNA-Kontrolle bereits erreicht und die Aktivität *in vivo* demonstriert.^[196] Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um Cetuximab – einem durch die FDA zugelassenen anti-EGFR-Antikörper-Therapeutikum.

Während Peptid-DNA-Konjugate durch den Einbau einer selektiv reaktiven Einheit im Verlauf der Peptid- und der DNA-Synthese vergleichsweise einfach zugänglich sind, werden zur Generierung von Protein-DNA- oder Protein-PNA-Konjugaten Techniken benötigt, die die Funktionalisierung des Proteins erlauben. Diese können kovalent / nicht-kovalent und spezifisch / unspezifisch sein.^[197, 198] Unspezifische Ligationsmethoden beruhen oftmals auf einer ubiquitär vorhandenen reaktiven Einheit, etwa dem Amin einer Lysinseitenkette oder dem Thiol eines Cysteins. Diese können durch Elektrophile wie Maleinimide und Aktivester oder andere „Crosslinker“ zur Reaktion gebracht werden, allerdings ohne akkurate Kontrolle über Position und Stöchiometrie. Werden diese Reaktionen wiederum durch ein strukturgebendes Element ergänzt, wie etwa durch den natürlichen Liganden des Proteins, kann die Konjugation unter Templatkontrolle selektiv ablaufen.^[199] Selektive Reaktionen werden oftmals durch Erzeugung einer einzigartigen reaktiven Einheit am Protein, durch den Einbau unnatürlicher Aminosäuren oder eine vorhergehende enzymatische Umwandlung erreicht. Das Enzym kann dabei entweder eine neue Funktionalität einbauen oder eine Erkennungssequenz direkt mit dem modifizierten Oligonukleotid verknüpfen (z.B. Transglutaminase, Sortase). In letzterem Fall muss das POI zuvor um die Erkennungssequenz ergänzt worden sein. Anders, kann das POI auch direkt mit einem selbst-markierenden Enzym wie SNAP, CLIP oder Halo fusioniert werden.^[200] Als gängige nicht-kovalente Modifikationsmethoden sollen hier nur die Nickel-Hexahistidin-,

Biotin-Streptavidin- bzw. Biotin-Monoavidin- und die Aptamer-Protein-Interaktion kurz genannt werden.^[198] Auch Coiled-Coil-Peptide^[201] und helikale Zinkfinger-Peptide,^[202] die mit DNA wechselwirken wurden genutzt, um Proteine an DNA-Arrays zu immobilisieren. In der Gruppe um Morii *et al.* beispielsweise wurde eine Kombination von enzymatischen *tags* (SNAP, CLIP, Halo) und selektiven Zinkfinger-Peptiden (zif269 und AZP4) verwendet, um die parallele, orthogonale Konjugation verschiedener DNA-Stränge an unterschiedliche Proteine und deren effiziente und selektive Immobilisierung auf Oberflächen zu ermöglichen.^[203]

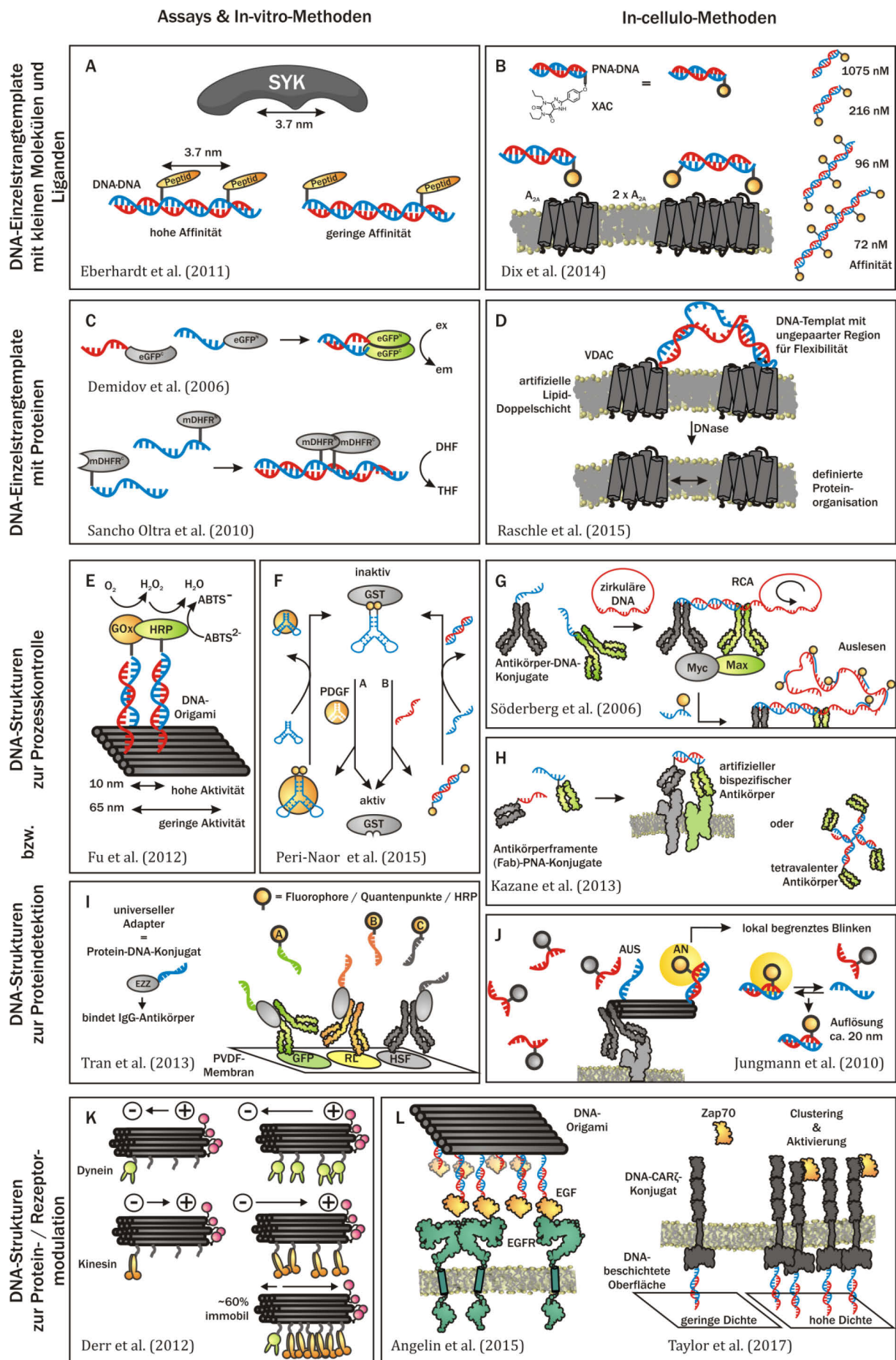
Eine besondere Herausforderung stellt die Erzeugung solcher Protein-DNA-Konjugate in zellulären Systemen dar. Hier dominieren zwei Methoden: i) die Bildung von Fusionsproteinen vor allem mit enzymatischen *tags* (SNAP, CLIP, Halo) oder ii) die nicht-kovalente Interaktion mit *ex-cellulo* hergestellten Antikörper-DNA-Konjugaten. Diese Methoden gehen mit einem nicht vernachlässigbaren Größenzuwachs einher – ca. 20 – 25 kDa für die genannten Enzyme und 150 kDa für IgG-Antikörper. In der räumlichen Betrachtung ist in einem Antikörper-DNA-Konjugat das Oligonukleotid etwa 10 nm von dem eigentlichen POI entfernt.

PNA- und DNA-basierte proteinbindende Systeme

DNA- und RNA-Stränge wurden vielfach genutzt, um gezielt Reaktionen zu ermöglichen. Liegt ein Templatstrang vor, so werden zwei DNA- oder PNA-gebundene reaktive Einheiten in Nähe und somit zur Reaktion gebracht. Damit kann das Vorhandensein einer bestimmten Sequenz, etwa einer krankhaften Mutation, mit einer biologisch aktiven Ausgabe verknüpft werden.^[11] DNA- und RNA-Templatreaktionen stellen ein breites Feld dar, welches hier nicht in der Tiefe beleuchtet werden soll.^[15, 31, 204, 205] Im hiesigen Kontext sind allerdings jene Systeme von Bedeutung, deren Ausgabe einen proteinregulatorischen Effekt hat. So zeigten Erben *et al.*, dass reaktive PNA-Peptid-Konjugate nur in Anwesenheit einer komplementären DNA zum Aminosäuretransfer gebracht werden können.^[206] Die dadurch initiierte Bildung eines BIR3-bindenden Peptids zeigte im Zelllysate eine biologische Aktivität allein in Anwesenheit des komplementären Strangs. Analog können RNA-Templates im Zellinneren durch zellpermeable PNA-Peptid-Varianten angesteuert werden.^[207] Neben der Erzeugung von peptidischen Liganden durch eine templatgesteuerte Reaktion, kann das Bindungsverhalten an ein Protein auch durch die Konformation bestimmt werden.^[208, 209] So eignen sich PNA-Peptid-Chimären als schaltbare Präsentationssysteme, indem die PNA·DNA-Interaktion die Peptidstruktur vorgibt.

Die Schaltbarkeit DNA-basierter Architekturen ist eine Eigenschaft, die gezielt genutzt werden kann, um Bindungsmodi zu bestimmen und Logikgatter und –schaltkreise zu erzeugen.^[12, 210-214]

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung



2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

Abb. 9 Beispiele zur Anwendung von DNA und PNA in der Untersuchung von Proteinen.

A) Ein DNA-Einzel- bzw. Doppelstrang kann genutzt werden, um Peptid-tragende komplementäre DNA-Stränge zu organisieren. Der Abstand der Peptide „KpYETLG“ definiert ihre Affinität zum Protein Syk.^[162]

B) Am Beispiel der Verbindung XAC und deren Organisation gegenüber dem membranständigen GPCR A_{2A} zeigte die Gruppe um Appella *et al.*, dass PNA·DNA-Gerüste zur Affinitätssteigerung genutzt werden können.^[171]

C) Das Zusammenführen zweier Hälften eines gespaltenen Proteins durch DNA-Template kann dessen Funktion als Chromophor oder Enzym wiederherstellen (ex – Anregung; em – Emission; DHF – Dihydrofolsäure; THF – Tetrahydrofolsäure; DHFR - Dihydrofolsäurereduktase).^[172, 173]

D) Wasserunlösliche GPCRs wie VDAC können in künstlichen Lipidschichten rekonstituiert werden. Um deren Lokalisation zu einander zu definieren können temporär DNA-Template eingebaut werden.^[215]

E) Die Gruppen um Niemeyer *et al.* und Yan *et al.* etablierten gekoppelte Enzymsysteme, deren Substratumsatz abhängig von der Positionierung beispielsweise auf einer durch Origami-Technologie erzeugten DNA-Fläche ist (GOx – Glucose-Oxidase; HRP – Meerrettichperoxidase; ABTS – 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)).^[174, 181]

F) Schaltbare DNA-Systeme erlauben die Proteinaktivität zu regulieren. So kann Glutathiontransferase (GST) durch die bivalente Präsentation eines Inhibitors (gelb – Etacrynamid) an einem Aptamer blockiert werden. Durch (A) Bindung des Aptamers an seinen Bindungspartner PDGF oder (B) die Öffnung der Aptamerstruktur durch einen komplementären Strang kann GST aktiviert werden.^[216]

G) In einem Protein-Ligationsassay (PLA) wird die Nähe zweier Proteine genutzt, um zwei modifizierte Antikörper so zu organisieren, dass die angebrachten DNA-Stränge einen Primer für die *rolling circle amplification* (RCA) darstellen. Proteine können so in und auf Zellen sensitiv quantifiziert werden.^[217, 218]

H) PNA-konjugierte Fab-Fragmente können durch Hybridisierung in bi- und tetravalenten Strukturen als mono- und bispezifische Antikörperimitate verwendet werden.^[193]

I) In Verbindung mit DNA kann das IgG-bindende Protein EZZ als universaler Adapter für primäre Antikörper fungieren. Anstelle der limitierten Anzahl an Spezies für sekundäre Antikörper kann eine Vielfalt an Auslesemethoden durch einen modifizierten komplementären DNA-Strang ermöglicht werden (RL – Renilla Luciferase; HSF – Hitzeschockfaktor).^[219]

J) Die hochauflösende Mikroskopiemethode DNA-PAINT von Jungmann *et al.* basiert auf einem „Blinken“ durch Assoziation und Dissoziation eines DNA-Strangs. Der angebrachte Fluorophor wird nur bei Assoziation zur Fluoreszenz angeregt. Durch Anbringung an eine definierte DNA-Struktur können während der Fluoreszenzmikroskopie zwei benachbarte Signale zur Abstandsmessung genutzt werden.^[220, 221]

K) DNA-Strukturen, die mit einer festgelegten Zahl an Dyneinen und Kinesinen versehen sind, können die Bewegung der Proteine auf einer Mikrotubulinoberfläche erkennbar machen. Die Bewegungsintensität und -richtung wird von der Anzahl und dem Anteil an Dyneinen und Kinesinen bestimmt und kann durch die fluoreszente Markierung des DNA-Gerüsts verfolgt werden (rosa).^[188]

L) EGF-tragende DNA-Strukturen bewirken eine gesteigerte Aktivierung des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche (links).^[183] Anstelle der Zugabe eines natürlichen Liganden zur Induktion von Rezeptorclustering, kann auch die Dichte an komplementären DNA-Strängen auf einer Oberfläche genutzt werden, um die Rezeptororganisation von DNA-modifizierten CAR ζ -Rezeptoren zu steuern (rechts). Eine hohe Dichte an DNA (rot) führt zur Zusammenlagerung der DNA-CAR ζ -Konjugate und rekrutiert in der Folge weitere Interaktionspartner wie Zap70.^[222]

Auch hochgradig komplexe dynamische Systeme basieren zumeist auf relativ simplen und kontrollierbaren Austausch- und Verdrängungsprozessen, die in Kapitel 4.5 näher vorgestellt werden.^[223] Werden also die Bindungspartner eines Proteins an einem DNA-basierten schaltbaren Gerüst verankert, kann die Bindungsaffinität hin und her geschaltet werden.^[27] Peri-Naor und Margulis *et al.* generierten ein Aptamer-gesteuertes System aus bivalenten GST-Bindern (Abb. 9F).^[216] Das Ligand-verknüpfte Aptamer blockierte die GST-Aktivität solange bis A) das Aptamer-bindende Protein PDGF oder B) die zum Aptamer komplementäre Sequenz hinzugegeben wurde. Das GST wurde aktiviert. Durch Zugabe an unmodifiziertem Aptamer konnte das GST-Protein wieder deaktiviert werden. Ähnliche schaltbare Systeme wurden zur Kontrolle der Affinität eines Antikörpers realisiert.^[224, 225]

Oligonukleotidgerüste zur Protein-Detektion, -Quantifikation und Visualisierung

Die Vielfalt von Protein-DNA-Konjugaten mit und ohne PNA wurde bereits in vorhergehenden Abschnitten dargestellt. Neben der Vielzahl an DNA-basierten Bindungsassays^[27] sollen an dieser Stelle nur beispielhaft einige konkrete Anwendungen gezeigt werden, mit dem Fokus auf die Untersuchung von membranständigen Proteinen auf Zellen. Gerade in der biologischen Umgebung einer Zelle können Oligonukleotide gegenüber anderen synthetischen Molekülen von Vorteil sein, etwa da keine Toxizität zu erwarten ist. Allerdings muss die Degradation von DNA- und RNA-basierten Systemen berücksichtigt werden.

Ein interessantes Beispiel, wie die Kodierung durch DNA als „molekularen Strichcode“ genutzt werden kann, um das Spektrum an Auslesemöglichkeiten zu erweitern demonstrierte die Gruppe um Luo *et al.* (Abb. 9I).^[219] Sie erzeugten einen „universellen Adapter“ aus dem IgG-bindenden Protein EZZ, welches als Fusionsprotein mit SNAP mit einer DNA-Sequenz versehen werden konnte. Dieser Adapter bietet also die Möglichkeit zum einen mit vielen denkbaren Primärantikörpern eine Spezifität gegenüber einem Protein zu erzeugen und zum anderen durch die Sequenz der DNA ein breites Spektrum an Auslesevarianten zu erlauben. Fluorophore, Quantenpunkte und Enzyme wurden dafür genutzt. Durch Selektivität der DNA kann im Ergebnis eine Vielzahl von Proteinen zeitgleich ausgelesen werden, ohne durch das begrenzte Spektrum an Sekundärantikörper-Wirtsspezies (Kaninchen, Maus etc.) limitiert zu sein.

Die direkte Konjugation von proteinbindenden Antikörpern oder Aptameren mit DNA-Sequenzen kann genutzt werden, um in einem Verfahren namens Immuno-PCR durch Vervielfältigung des DNA-Strangs in der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) auch geringe Proteinmengen detektierbar zu machen.^[226, 227] Werden die Antikörper-DNA-Konjugate so gestaltet, dass durch die Bindung an das Zielmolekül, etwa ein membranständiges Protein, eine Reaktion in Gang gesetzt wird, spricht man von einem *proximity ligation assay* (PLA).^[13, 228, 229] Dieser kann mit Aptameren oder Antikörpern zur sensitiven Quantifikation oder Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen auf der Zelloberfläche wie auch im Zellinneren genutzt werden. Söderberg *et al.* kombinierten diesen Proximitätsassay mit der *rolling circle amplification* (RCA) in fixierten Zellen und konnten so die Interaktion der Proteine Myc und Max bei Stimulation mit dem Liganden Interferon- γ nachweisen (Abb. 9G).^[217] Neben Antikörpern können auch DARPs (*designed ankyrin repeat proteins*) genutzt werden, um etwa RTKs auf der Zelloberfläche zu adressieren.^[218]

Neben der gesteigerten Sensitivität bei der Quantifizierung von Proteinen in Zellen kann auch die Kenntnis über die Lokalisation durch hochauflösende Mikroskopie (SRM, *super-resolution microscopy*) mit Hilfe von DNA-basierten Methoden verbessert werden. SRM-Methoden umgehen die Abbe'sche Auflösungsgrenze von ca. 200 nm zum einen durch stochastische

Rechnung, zum anderen durch bestimmte Anregungs- und Auslesemethoden meist an schaltbaren Fluorophoren.^[230] In erstem Fall werden Intensitäten einzelner Bildpunkte gemessen und der Ursprung der Fluoreszenz errechnet (z.B. STORM, PALM). Das prominenteste Beispiel zur Anwendung eines bestimmten Anregungsmusters, der zweiten Methodenkatgorie, ist die STED-Mikroskopie, in der ein Anregungs- und eines Abblendlaser so eingesetzt werden, dass nur in einem geringen Radius Moleküle zur Fluoreszenz angeregt werden.^[231] In der Untersuchung membranständiger Proteine spielen solche Methoden eine zunehmend große Rolle.^[38] Die 2006 entwickelte Methode PAINT (*point accumulation in nanoscale topography*) basiert auf der Verwendung eines Fluorophors, welcher bei Bindung an ein Zielmolekül eine erhöhte Fluoreszenz aufweist.^[232] Die Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht führt zu einem kurzzeitigen „Blinken“ des Farbstoffs, welches rechnerisch lokalisiert und mit einer Auflösung von ca. 20 nm dargestellt werden kann. Mit Bindung des Fluorophors an einen Liganden kann eine Spezifität erzeugt werden (uPAINT).^[233] Oligonukleotide können in Kombination mit PAINT genutzt werden, indem Interkalatoren temporär gebunden wurden^[234] oder eine Sequenz durch eine komplementäre fluorophormarkierte DNA-Sequenz adressiert wird. Letztere Methode wurde unter dem Namen DNA-PAINT in den Gruppen um Simmel *et al.* und Tinnefeld *et al.* an Origamistrukturen entwickelt.^[220, 235] Sie kann mit einem Totalreflexionsmikroskop (TIR) ohne zusätzlichen technischen Aufwand betrieben werden. Kurze 8mer-DNA-Stränge, erzeugen durch ein stetiges Hybridisieren / Dehybridisieren ein detektierbares Blinken und ermöglichen es, definierte Abstände auf Origamistrukturen zu messen.^[236, 237] In der Mikroskopie an Zellen können solche Strukturen als molekulare Lineale und damit als interner Maßstab genutzt werden (Abb. 9J).^[221] Die Selektivität der DNA-Bindung erlaubt es zudem, mehrere verschiedene Fluorophore selektiv an unterschiedlichen Positionen zu installieren (Exchange-PAINT).^[238] Ob in Verbindung mit einer komplexen DNA-Struktur, oder durch direkte Konjugation einer DNA-Sequenz an ein Zielmolekül / Antikörper – DNA-PAINT hat sich innerhalb der letzten Jahre zu einer etablierten Methode zur Proteindetektion in Zellen entwickelt.^[239-241] Damit steigt auch der Bedarf nach simplen und universellen Strategien zur Erzeugung von Protein-DNA-Konjugaten in lebenden Zellen.

Ist eine DNA-Sequenz am POI installiert, so kann sie neben der hochauflösenden Mikroskopie auch dynamisches Schalten, etwa Strang-Verdrängungs- und -Austausch-Prozesse und die parallele Verwendung mehrerer Farbstoffe erleichtern. In der Gruppe um Diehl *et al.* wurde eine Strategie entwickelt DNA-Sequenzen über Coiled-Coil-Peptide nicht-kovalent an Proteine zu binden.^[201, 242] Diese DNA-Protein-Konjugate wurden in Zellen selektiv durch komplementäre DNA-Stränge markiert und konnten durch einen weiteren DNA-Verdrängungsstrang wieder befreit werden.^[243] Verschiedene Proteine wurden so sequenziell ausgelesen.^[244] Zudem wurde gezeigt, dass durch das Anbringen verzweigter Strukturen mehrere fluoreszente Oligo-

nukleotide rekrutiert werden können und somit die Helligkeit erhöht wird.^[245] In einer Weiterentwicklung zeigten Rudchenko *et al.*, dass dynamische Kaskaden an Zelloberflächen so geschaltet werden können, dass sie das Vorhandensein bestimmter Rezeptorkombinationen anzeigen können.^[246]

Oligonukleotide zur Kontrolle der Rezeptororganisation

Über die passiven Prozesse des Auslesens und Lokalisierens von Rezeptoren auf Zellen hinaus kann aktiv die Organisation und Aktivität von Rezeptoren durch DNA-Systeme bestimmt werden. Während Quantifikation und Detektion auch an fixierten Zellen durchgeführt werden kann, erfordert die DNA-gesteuerte Regulation von Rezeptorprozessen die Anwendung lebender Zellen. Eine Ausnahme bilden hier Modellsysteme wie artifizielle Lipiddoppelschichten, in denen unlösliche Transmembranproteine räumlich durch Anbindung an DNA organisiert werden können (Abb. 9 D).^[215] Die Abspaltung der DNA durch Nukleasen hinterlässt die Proteine in gewünschter Orientierung in der Membran. In Abb. 7B und 7C (Seite 14) wurden bereits Beispiele gezeigt, in welchen Aptamere genutzt wurden, um die Proximität zweier Rezeptoren herzustellen und dadurch eine gegenseitige Phosphorylierung einzuleiten. Durch Origami-Technologie erzeugte Strukturen erlauben es mehrere Liganden in präzisen Abständen gegenüber Rezeptoren an Zelloberflächen zu präsentieren. Aus der Gruppe um Niemeyer *et al.* stammt eine als „MOSAIC“ (*multiscale origami structures as interface for cells*) betitelte Methode (Abb. 9 L).^[183] Hier wurden bis zu zwölf EGF-Moleküle an einer DNA-Fläche präsentiert und die Phosphorylierung des EGFR detektiert. Die stärkste Aktivierung wurde verzeichnet, wenn acht EGF mit einem maximalen Abstand von 50 nm aufgebracht wurden. Wurden die Abstände auf ca. 21 nm verringert, fiel die Rezeptoraktivierung geringer aus. Dieses Beispiel demonstriert, wie multivalente DNA-Strukturen die Aktivität des EGF-Rezeptors steuern können.

Dass Oligonukleotide weder Liganden noch Aptamere tragen müssen, um Rezeptoren an Zelloberflächen zu organisieren, demonstrierten kürzlich Taylor *et al.*^[222] Sie verknüpften den intrazellulären und Transmembranteil des Rezeptors CAR ζ über das fusionierte Protein SNAP mit einer 16mer-DNA-Sequenz (Abb. 9L). Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) imitieren T-Zell-Rezeptoren und werden somit zur Untersuchung von Teilprozessen in der Immunantwort eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Rekrutierung nachgelagerter Proteine in der Signaltransduktion von T-Zell-Rezeptoren, begonnen mit der Bindung von Zap70, durch die Organisation der DNA-CAR ζ -Konjugate bestimmt werden konnte. Eine Organisation der Rezeptoren in stabile Cluster war ausreichend, um weiterführende Transduktionsprozesse einzuleiten.

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

Es ist bemerkenswert, wie weit gefächert die Bandbreite an Möglichkeiten ist, die DNA-PNA-basierte Systeme in der Untersuchung von Proteinen bieten. Als „molekularer Strichcode“ kann eine Vielzahl an Proteinen parallel gekennzeichnet werden und sensitiv quantifiziert oder hochaufgelöst lokalisiert werden. Ihre Aktivität kann kontrolliert und modifiziert werden. Umso erstaunlicher ist es, dass die wesentlichen Konjugationsmethoden auf die Herstellung von Antikörper-Konjugaten, die Verwendung von Aptameren und eine Klonierung als Fusionsprotein mit SNAP / CLIP begrenzt sind.

2.4) PNA·PNA- & PNA·DNA-Interaktionen in der Proteinbiologischen Anwendung

3) Zielstellung

Die Visualisierung proteinbasierter Abläufe ist ein Schlüssel zum Verständnis zellulärer Prozesse. Dies erklärt die herausragende Rolle, die der Fluoreszenzmikroskopie in der zellbiologischen Forschung zukommt. Daraus ergibt sich der Bedarf an Methoden, die eine schnelle und selektive Markierung von Proteinen ermöglichen. Darüber hinaus ist es wünschenswert, die Funktion von Proteinen gezielt steuern zu können, um Zusammenhänge zu erforschen oder Prozesse zu kontrollieren. Erkennungsmodule wie Oligonukleotide oder Peptidpaare können hierbei genutzt werden, um die Proximität zweier Proteine oder Liganden zu erzeugen und damit die Aktivität eines Proteins zu beeinflussen.^[15, 19, 24, 26, 31, 32, 123, 140, 222, 247]

Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage von Coiled-Coil-Peptiden und Peptidnukleinsäuren Methoden zur Markierung und Manipulation von Proteinen an lebenden Zellen zu etablieren.

Um die programmierbaren Bindungseigenschaften von Oligonukleotiden und deren Analoga, wie etwa PNA, in der Proteinchemie und -biologie zu nutzen, müssen diese zunächst in das jeweilige Zielmolekül eingeführt werden. Hierfür sollte das Konzept des Coiled-Coil-vermittelten PNA-Transfers etabliert werden. Im Gegensatz zu Antikörpern oder SNAP-tags sollte die Größe der Proteinmodifikation gering bleiben und die kovalente Verknüpfung dennoch mit hoher Spezifität gelingen. Als aussichtsreich erschien es, die Wechselwirkung zweier Coiled-Coil-Peptide nutzbar zu machen, um einen PNA-Strang von einem Donorpeptid auf ein proteinständiges Akzeptorpeptid zu übertragen (Abb. 10). Die Coiled-Coil-Peptide erhöhen dabei die Proximität der reaktiven Einheiten **X** und **Y**. Da so mit geringen Konzentrationen an PNA-Donoren gearbeitet werden kann, wird eine mögliche Hintergrundreaktion gering und die Selektivität hoch gehalten. In dieser Arbeit sollten zwei verschiedene reaktive Einheiten für den Transfer untersucht werden: Thioester und Sulfonsäureester als elektrophile Donoreinheiten **Y**. Die Synthese funktionaler PNA-Donor-Konjugate sollte auf eine Weise etabliert werden, die eine leichte Austauschbarkeit der PNA- und Peptid-Sequenzen sowie der reaktiven Einheiten erlaubt. Die funktionalen PNA-Donoren sollten in ihren Transfereigenschaften verglichen und auf biologische Systeme übertragen werden.

In einem zellulären System kann ein spezifisch installierter PNA-tag als eine Art molekularer Strichcode betrachtet werden. Idealerweise sollte er über einen komplementären Strang selektiv adressierbar sein. In dieser Arbeit sollte der PNA-tag zur Visualisierung und/oder Regulierung von membranständigen Rezeptoren genutzt werden. Insbesondere die Manipulation des EGF-Rezeptors auf lebenden Zellen war von großem Interesse, da dieser Rezeptor Ziel zahlreicher Tumorthérapien ist und dennoch nicht vollkommen in seiner Wirkweise verstanden ist. Die vorgestellte Methode des PNA-tags sollte die Signifikanz der Dimerisierung untersuchen und ein allgemein anwendbares Werkzeug zur Rezeptormodulation und -markierung liefern (Abb. 10).

3) Zielstellung

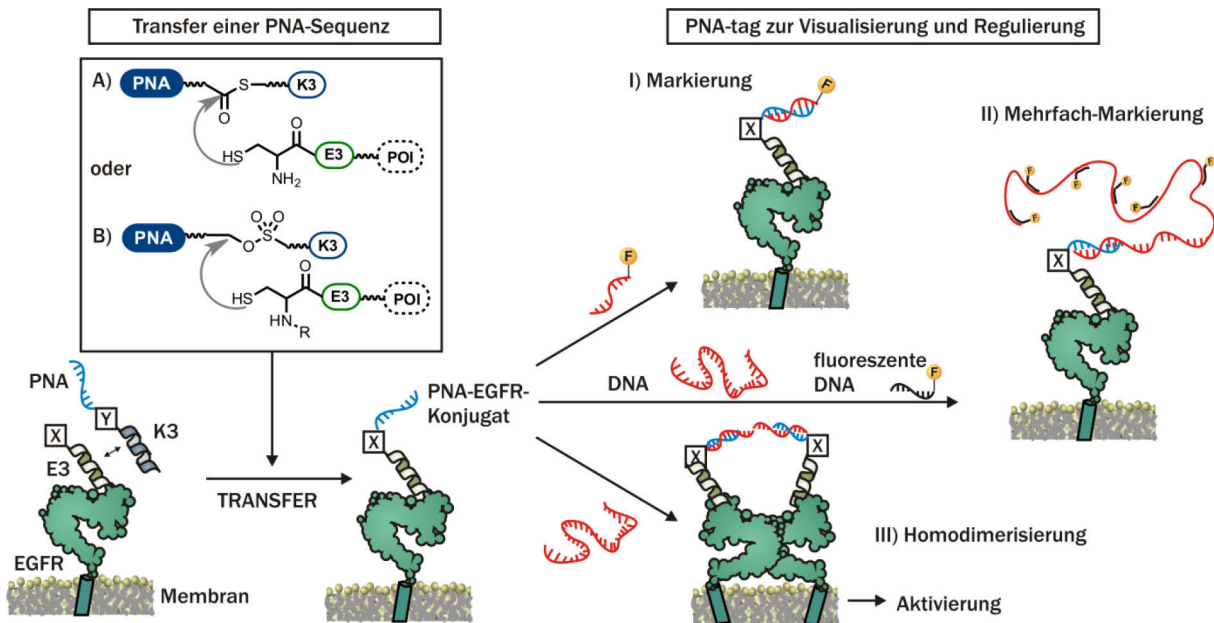


Abb. 10 Schema der PNA-Markierung von Proteinen an lebenden Zellen. Durch die Peptide E3 und K3 werden die reaktiven Einheiten **X** (Cystein) und **Y** (Thioester oder Sulfonyl) in Nähe gebracht. Je nach Wahl des Donors entsteht über Reaktion A (NCL-artig) oder B (LDT-artig) das PNA-EGFR-Konjugat. Dies ermöglicht diverse Anwendungen: I) Visualisierung durch fluoreszente markierte DNA; II) verstärkte Visualisierung durch einen Adapter-DNA-Strang (rot), der mehrere fluoreszente Oligonukleotide (schwarz) rekrutieren kann; C) Dimerisierung zweier Rezeptoren über einen verbrückenden DNA-Strang.

Coiled-Coil-Peptide und Oligonukleotide eignen sich auch unabhängig voneinander als regulatorische Einheiten von biologischen Systemen.

Zwei orthogonale Coiled-Coil-Peptidpaare sollten genutzt werden, um zwei verschiedene Fluorophore auf zwei unterschiedliche Rezeptoren auf der Oberfläche lebender Zellen zu übertragen. Im Fokus lag dabei vor allem die Wahl der Peptidpaare und detaillierte Analyse der parallel ablaufenden Transferreaktion (Abb. 11A).

Inspiziert von dynamischen DNA-Systemen sollte untersucht werden, ob Coiled-Coil-Paare durch Verlängerung mit einem peptidischen Überhang ebenfalls in analogen Strang-Verdrängungs-Prozessen anwendbar sind (Abb. 11B). Dies kann genutzt werden, um die funktionalen Einheiten **A** und **B** in Nähe zu bringen und wieder zu trennen. Der Einfluss der Peptidlänge und -art sollte systematisch untersucht und genutzt werden, um schaltbare Systeme zu entwickeln. In solchen Systemen sollte zwischen einem bivalenten AN- und einem monovalenten AUS-Zustand eines Proteinliganden gewechselt werden können. Am Beispiel des peptidbindenden Proteins Syk sollte überprüft werden, ob schaltbare Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation genutzt werden können.

Bei erfolgreicher Markierung eines Rezeptors mit einer PNA-Sequenz sollte untersucht werden, ob auch hier ein dynamisch-schaltbares System erzeugt werden kann. Hierfür sollte ein komplementärer DNA-Strang mit einem Überhang versehen und nach Visualisierung durch Zugabe eines ebenfalls verlängerten PNA-Strangs wieder verdrängt werden können (Abb. 11C). Somit sollte auch die Funktion des PNA-tag schaltbar sein.

3) Zielstellung

In der Summe soll diese Arbeit ein Repertoire an Methoden zur Proteinmarkierung und -modulation bieten.

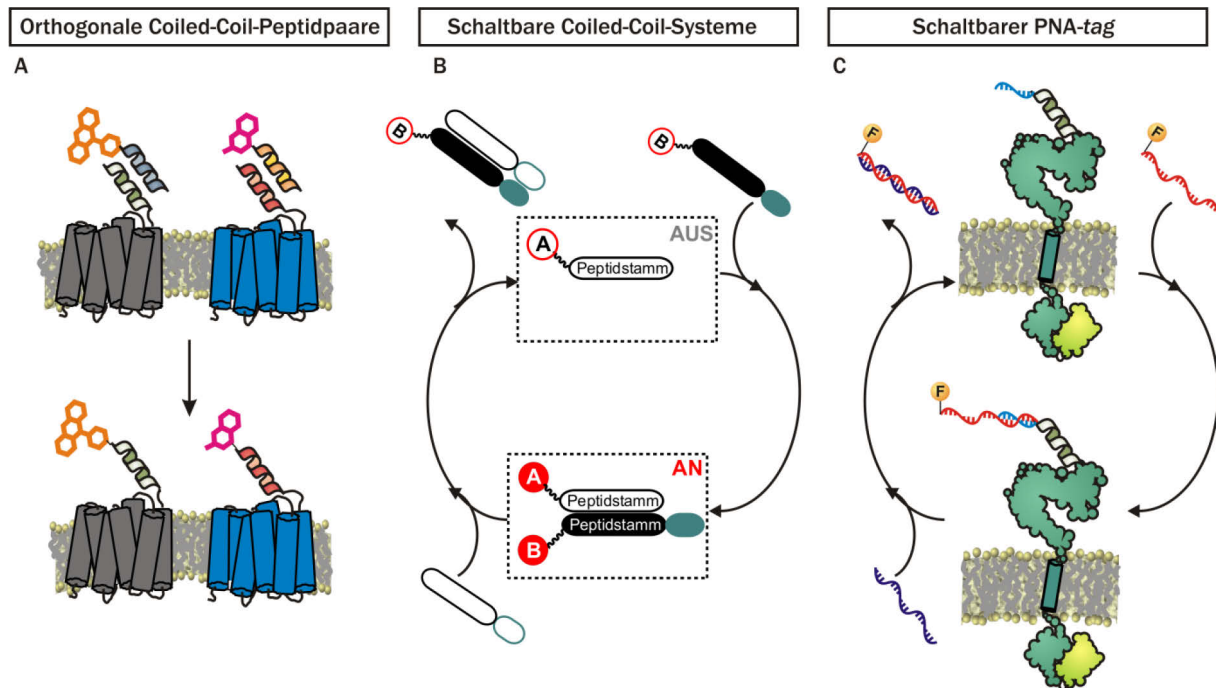


Abb. 11 Coiled-Coil- und PNA-basierte Systeme zur Visualisierung und Schaltung. A) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur parallelen Markierung zweier Rezeptoren. B) Schaltbare Coiled-Coil-Systeme zur Induktion / Aufhebung der Nähe zweier Gruppen A und B. C) Schaltbarkeit des PNA-tags: nach Markierung durch eine verlängerte DNA soll diese wieder verdrängt werden können.

SEKTION I

-

DER PNA-TRANSFER

Im ersten Abschnitt wird der Transfer von PNA auf Cysteinyl-E3-Peptide über PNA-K3-Peptid-Konjugate vorgestellt. Hierfür wird die Synthese solcher PNA-Donoren auf Basis von Sulfonsäureestern (4.1.2.1) und Thioestern (4.1.2.2) als reaktiven Einheiten beschrieben. Die Reaktivität und Selektivität der Donoren in der Übertragung von PNA wird überprüft und verglichen. Die Arbeit führt zur Empfehlung eines besonders geeigneten Donors für die Erzeugung von PNA-POI-Konjugaten in zellulärer Umgebung.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Anwendung von PNA-Donoren an lebenden Zellen. Es wird beschrieben, wie zwei Rezeptoren aus der Familie der GPCRs (4.2.2) und der EGFR (4.2.3) aus der Familie der RTKs mit einem PNA-*tag* versehen und nachfolgend durch eine fluoreszente PNA- oder DNA-Sequenz markiert werden. Die Stabilität der Markierung wird untersucht und eine Erweiterung durch Mehrfach-Markierung vorgestellt (4.2.4).

Der dritte Abschnitt befasst sich mit der Modulation der Rezeptoraktivität durch den PNA-*tag*. Einleitend werden bisherige Kenntnisse zum Mechanismus der EGFR-Aktivierung vermittelt (4.3.1). Der Einfluss einer Verbrückung zweier EGF-Rezeptoren auf die Autophosphorylierung wird über die biochemischen Methoden der Western Blot-Analyse (4.3.2.2) und der Immunofluoreszenz (4.3.2.3) untersucht. Die Internalisierung des Rezeptors wird über Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (4.3.2.4). Die Prozesse der Dimerisierung und der Ligandgabe können dabei stets von einander entkoppelt betrachtet werden, sodass bisherige Kenntnisse zur EGFR-Aktivierung im biologischen Kontext erweitert werden können (4.3.3).

4) Ergebnisse und Diskussion

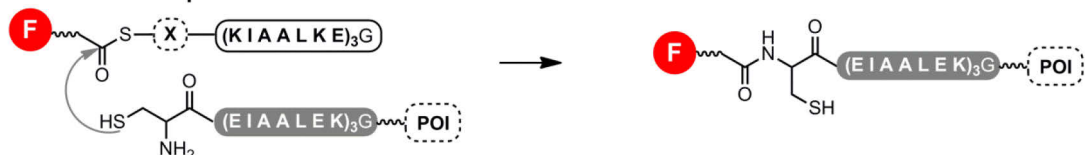
4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

4.1.1) Konzept der PNA-Donoren auf Basis von Coiled-Coil-Peptiden

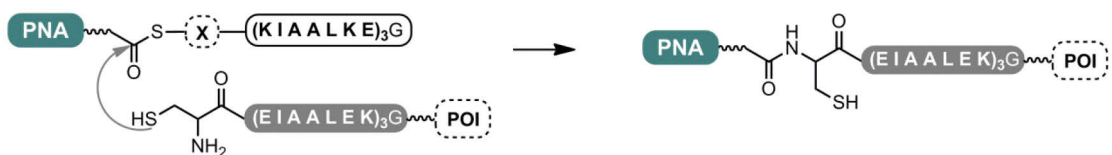
Konzept

Coiled-Coil-Peptide wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten von Reinhardt *et al.* genutzt, um über eine NCL-artige Reaktion Fluorophore von einem Donorpeptid auf ein Akzeptorpeptid zu übertragen (Abb. 12A).^[77, 82] In Anlehnung an diese Vorarbeiten sollten Donorpeptide hergestellt werden, die in der Lage sind, anstelle von Farbstoffen PNA-Oligomere zu übertragen. Dabei sollte neben der NCL-artigen Reaktion zwischen einer Thioestereinheit **X** im Donor und einem N-terminalen Cystein im Akzeptor (Abb. 12B) auch die Transferreaktion über Sulfonsäureester-basierte Chemie, im folgenden als Sulfonat-basiert abgekürzt, untersucht werden (Abb. 12C). Letztere resultiert in einer Thioetherbindung und bietet den Vorteil, dass auch interne Cysteine zugänglich sind. In der biologischen Anwendung kann das hilfreich sein, da N-terminale Cysteine nicht immer in hohen Ausbeuten exprimiert werden.^[248-250] Es ist vor allem vom Expressionsorganismus und dem Protein bzw. dessen Transportwegen abhängig, ob das endständige Methionin aus der Translation des Startcodons entfernt wird oder nicht. Im Folgenden wird die Wahl der einzelnen Komponenten Peptid, reaktive Einheit und PNA erläutert.

A) Thioester-basierter Fluorophor-Transfer



B) Thioester-basierter PNA-Transfer



C) Sulfonat-basierter PNA-Transfer

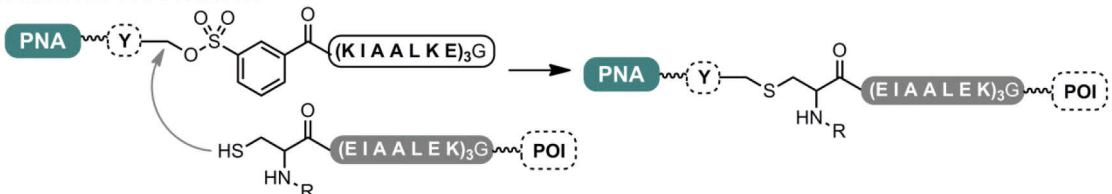


Abb. 12 Transferreaktionen: A) Der Transfer von Fluorophoren, auf Basis von Thioestern wie er von Reinhardt *et al.* entwickelt wurde. B) Thioester-vermittelter Transfer von PNA-Oligomeren von einem K3-Donorpeptid auf das E3-Akzeptorpeptid mit N-terminalem Cystein. C) Sulfonat-vermittelter Transfer von PNA-Oligomeren. X – variable Thioestereinheit; Y – variable Sulfonateinheit, R – restliche Aminosäurekette; F – Fluorophor; POI – protein of interest.

K3/E3-Coiled-Coil-Peptide

Die Donor- und Akzeptorpeptide sollten auf dem bereits bekannten K3/E3-Peptidpaar basieren. Diese Peptide erwiesen sich als brauchbar für den Thioester-vermittelten Transfer von Fluorophoren im Rahmen einer kovalenten Markierungsmethode (Abb. 12A). Die aus drei wiederkehrenden Heptaden bestehenden Peptide K3 - (KIAALEK)₃ und E3 - (EIAALEK)₃ zeigen mit einem $K_D = 64$ nM eine ausreichend hohe Bindungsaffinität, um die Proximität zwischen den reaktiven Einheiten zu erhöhen und die Transferreaktion ablaufen zu lassen.^[76] Da bereits Cysteiny-E3-markierte Rezeptorvarianten verschiedener GPCRs kloniert wurden und Experimente zum Transfer von Fluorophoren erfolgreich waren, wurden das K3-Peptid als Donor und das E3-Peptid als Akzeptor gewählt.

Wahl der reaktiven Einheiten

Die Sulfonat-basierte Transferreaktion sollte zunächst mit einer reaktiven Einheit **Y1** getestet werden, die auf der literaturbekannten Methodik der „LDT-Chemistry“ (*ligand-directed tosylate chemistry*) von Tsukiji *et al.* beruht (Abb. 13).^[62, 64] Durch solche Sulfonate war es möglich, selektiv Proteine in Zelllysate zu markieren, allerdings mit langen Reaktionszeiten von bis zu 48 h. Um die Reaktion zu beschleunigen, wurden auch die benzyllischen Varianten **Y2** und **Y3** in Betracht gezogen. Alle reaktiven Einheiten sollten mit einem Azid versehen werden, um die Verknüpfung mit einem PNA-Oligomer über kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) oder ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) zu ermöglichen. Die Einheiten **Y1** – **Y3** sollten nachfolgend durch Reaktion mit einem Sulfonylchlorid zum fertigen Linker umgesetzt werden. Über die Carboxyfunktion sollten die entsprechenden Linker dann an das N-terminale Amin des Donorpeptids geknüpft werden.

Die Wahl der Thioester richtete sich nach bisherigen Vorkenntnissen.^[82, 251] Arylische Thioester zeigen eine höhere Reaktivität, jedoch geringe Stabilität gegen Hydrolyse bei neutralem und basischen pH-Wert. Alkylische Thioester wiederum erweisen sich als stabiler, allerdings auch als weniger reaktiv. In Hinblick auf die zelluläre Anwendung ist eine ausgewogene Balance aus Stabilität und Reaktivität wünschenswert. Der Thioester soll reaktiv genug sein, um kurze Inkubationszeiten zu erfordern, allerdings nicht so reaktiv, dass es zu Hintergrundreaktionen kommt. Die Donoren sollten stabil genug sein, um in Puffer an den Reaktionsort an der Zellmembran gebracht werden zu können. Somit wurde zum einen der alkylische Thioester basierend auf Mercaptopropionsäure (MPA) und zum anderen der aromatische Thioester aus Mercatophenyllessigsäure (MPAA) in einer PNA-Transferreaktion getestet (Abb. 13B).

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

Wahl der Oligonukleotide

Das DNA-Analogon PNA sollte durch Donorkonjugate übertragbar gemacht werden, um die kontrollierbare Selektivität von Oligonukleotiden im Rahmen der Proteinchemie zu nutzen. Zum einen weist PNA im Gegensatz zu DNA eine höhere Stabilität gegen Degradation in zellulärer Umgebung auf. Zum anderen vermittelt PNA auch eine höhere Duplexstabilität sowohl als PNA·PNA-Duplex, wie auch als PNA·DNA-Duplex. Auch erzeugt das negativ geladene Rückgrat der PNA, im Gegensatz zur DNA, keine Repulsion mit den ebenfalls negativ geladenen Gruppen auf der Zelloberfläche. Diese Eigenschaften sollten in der späteren Anwendung zur Rezeptor-markierung von Vorteil sein. Um die Synthese zu etablieren und einen Eindruck von der Reaktivität zu erhalten, wurden zunächst kurze 3mer- und 6mer-Stränge verwendet. Später wurden die Stränge auf 11mer- und 16mer-PNA-Oligomere ausgeweitet (Abb. 13C). Die Sequenzen wurden so gewählt, dass sie eine Mischung aller Monomere darstellen, mit ausreichend hohem g/c-Anteil und ohne Tendenz zur Selbstkomplementarität.

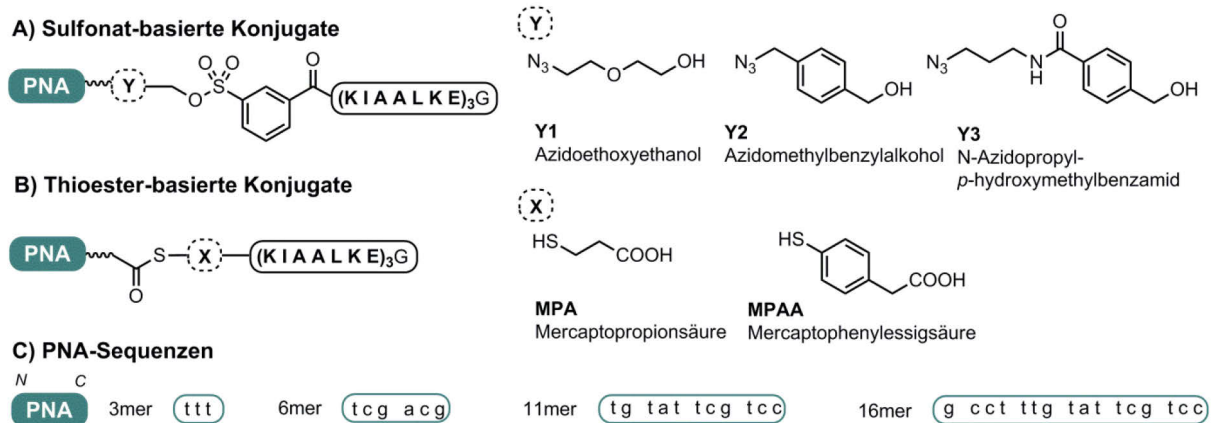


Abb. 13 Reaktive Einheiten und PNA-Sequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. A) Für den Sulfonat-vermittelten Transfer wurden PNA-Donor-Konjugate mit den Bausteinen **Y1** – **Y3** hergestellt. B) Thioester-basierte PNA-Donoren sollten entweder als stabilere MPA- oder reaktivere MPAA-Konjugate hergestellt werden. C) Die Sequenzlänge der PNA-Oligomere wurde in den Längen von 3, 6, 11 und 16 PNA-Monomeren variiert.

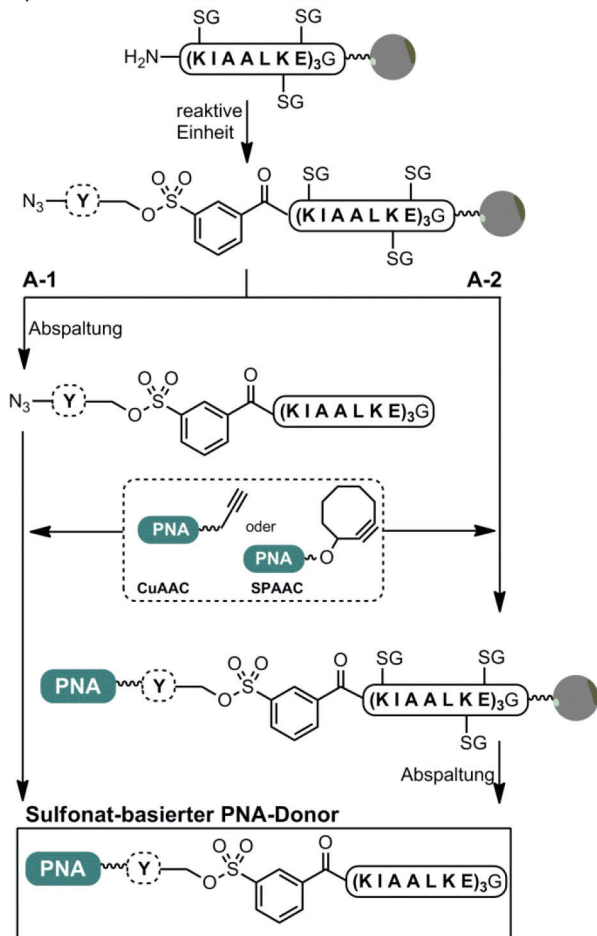
4.1.2) Synthese von PNA-Peptid-Konjugaten

Die reaktiven PNA-Peptid-Konjugate sollten auf eine Weise hergestellt werden, die eine leichte Austauschbarkeit der einzelnen Module – PNA, reaktive Einheit und Peptid – ermöglicht. Eine Option ist die konvergente Synthese, in der i) Sulfonat- bzw. Thioesterpeptid und ii) die PNA-Sequenz separat hergestellt werden. Diese beiden Einheiten werden im letzten Schritt verknüpft. Bei der Wahl der Konjugationschemie ist zu beachten, dass keine Nukleophile verwendet werden, die eine Reaktivität bezüglich der Sulfonat- oder Thioestereinheit aufweisen. Allgemein sollte sie orthogonal zu der Reaktivität freier Nukleobasen oder entschützter Peptidseitenketten sein. Click-Reaktionen erscheinen hierfür besonders vorteilhaft, da sie auch

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

große (Bio)Polymere effizient konjugieren können. Die kupferkatalysierte (CuAAC) und ringspannungsinduzierte (SPAAC) Azid-Alkin-Cycloadditionen erfüllen die genannten Kriterien.

A) Sulfonat-basierte PNA-Donoren



B) Thioester-basierte PNA-Donoren

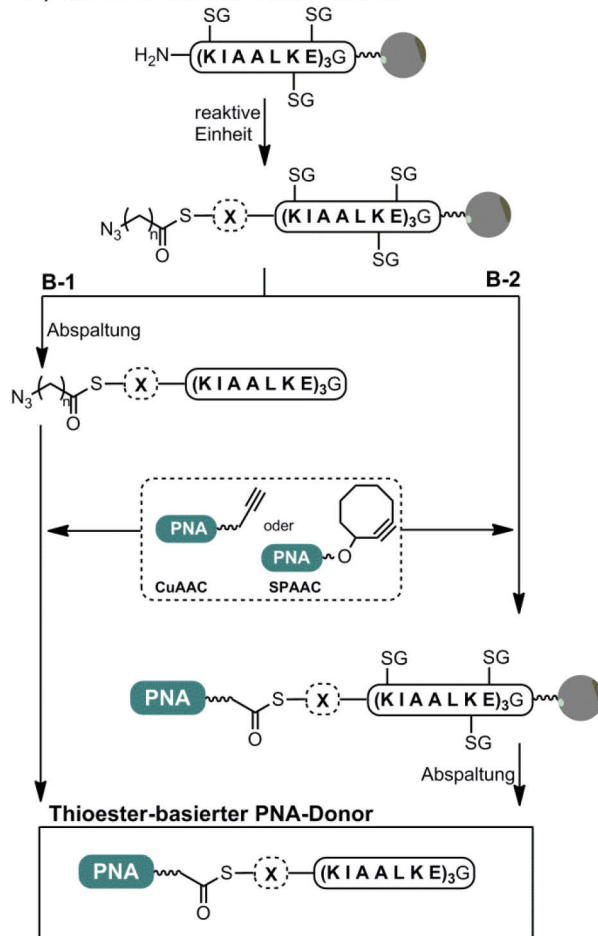


Abb. 14 Allgemeines Syntheschema A) Sulfonat- oder B) Thioester-basierter PNA-Donorpeptide. SG – Schutzgruppe; X – variabler Thioesterbaustein; Y – variabler Sulfonatlinker.

Aus den beschriebenen Anforderungen an die Modularität und die effiziente und schonende Konjugation von PNA und Peptid wurde das Syntheschema in Abb. 14 entwickelt. Die Synthese A) Sulfonat- und B) Thioester-basierter Donorpeptide startete jeweils bei der Darstellung des Peptids an der festen Phase. Die gewünschte reaktive Einheit sollte dann an das harzständige Peptid gekuppelt werden. Zur Synthese Sulfonat-verbrückter Konjugate (Abb. 14A) wurde an besonders säurelabilem Sieber-Amid-Harz gearbeitet, da bereits in vorhergehenden Studien festgestellt wurde, dass Sulfonate unter den üblichen sauren Abspaltbedingungen in Trifluoressigsäure (TFA) nicht stabil sind.^[252, 253] Hier muss eine β -Eliminierung zur freien Sulfonsäure befürchtet werden.^[254] Die Abspaltung vom Sieber-Amid-Harz erfolgte daher mit nur 2% TFA für maximal 2 min. Von diesem Zwischenschritt aus wurden zwei Optionen in Betracht gezogen:

A-1) Das Sulfonyl-Peptid wird vom Harz abgespalten und in Lösung über CuAAC oder SPAAC mit dem PNA-Oligomer verknüpft.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

A-2) Die Addition der PNA-Sequenz über CuAAC oder SPAAC wird an der festen Phase durchgeführt und anschließend das Produkt vom Harz freigesetzt.

Analog wurde die Synthese Thioester-basierter PNA-Donoren konzipiert (Abb. 14B). Das K3-Peptid sollte am Tentagel-Rinkamid-Harz (TGR-Harz) aufgebaut werden und anschließend der Thioester an der festen Phase generiert werden. Im Fall von Thioestern sind die sauren Abspaltbedingungen in TFA nicht problematisch. Auch in diesem Fall waren CuAAC und SPAAC entweder in Lösung (B-1) oder an der festen Phase (B-2) denkbar. Beide Vorgehensweisen haben Vor- und Nachteile. Findet die Reaktion am Harz statt, so kann nicht reagiertes oder im Überschuss eingesetztes Alkin leicht entfernt und gegebenenfalls wiedergewonnen werden. Eine Kupplung in Lösung hat den Vorteil, dass die Edukte bereits aufgereinigt sind und Nebenreaktionen, die zu schwierigen Trennproblemen führen können, vermieden werden.

4.1.2.1) Sulfonat-basierte PNA-Peptid-Konjugate über CuAAC und SPAAC

Azid-Alkin-Cycloadditionen

Die 1,3-dipolare Additionsreaktion zwischen Aziden und Alkinen unter Ausbildung eines Triazols wurde bereits 1963 von Huisgen beschrieben.^[255] Unter nicht-katalytischen Bedingungen verläuft sie allerdings sehr langsam und erfordert hohe Temperaturen. Die Reaktion gewann ab 2002 an Bedeutung, als aus den Gruppen um Sharpless *et al.* sowie zeitgleich Meldal *et al.* eine Beschleunigung und Selektivitätskontrolle durch die Zugabe von Kupfer(I)-Ionen berichtet wurde (Abb. 15A).^[45, 46] Dieser als CuAAC bekannte Reaktionstyp führte zur Prägung des Begriffs der Click-Reaktionen. Unter Click-Chemie werden Reaktionen verstanden, die in hohen Ausbeuten, stereoselektiv und unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, ohne störende Nebenprodukte zu bilden oder eine komplizierte Aufreinigung zu erfordern.^[256] Zuletzt wurde ein Mechanismus mit zweikernigem Kupferkomplex für die CuAAC postuliert, der regioselektiv zum 1,4-Triazol führt.^[257] Zahlreiche Reaktionsbedingungen wurden für die Konjugation eines terminalen Alkins mit einem Azid beschrieben.^[258] Allgemein können drei Arten der Kupfer(I)-Quellen unterschieden werden: i) direkte Zugabe in Form von Kupfersalzen wie CuI oder CuBr in Kombination mit basischen Aminen (Diisopropylethylamin, Triethylamin, Lutidin); ii) *in-situ* hergestellte Cu(I)-Ionen aus einer Cu(II)-Spezies (z.B. CuSO₄) mit mildem Reduktionsmittel (meist Natriumascorbat) überwiegend in wässrigem Puffer und in Anwesenheit Cu(I)-stabilisierende Liganden (TBTA, THPTA); iii) seltener auch *in-situ* hergestellte Cu(I)-Ionen aus Cu(0) und Cu(II), etwa als Reaktion an Kupferdraht oder Partikeln. In dieser Arbeit wurde für die Konjugation in Lösung (A-1) mit dem Liganden THPTA gearbeitet (Abb. 15C). Am Harz (A-2) wurde die Anwendung einer Cu(I)-Spezies aus Kupfersalzen gewählt, da organische Lösungsmittel für die Quelleigenschaften des Harzes vorteilhaft sind.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

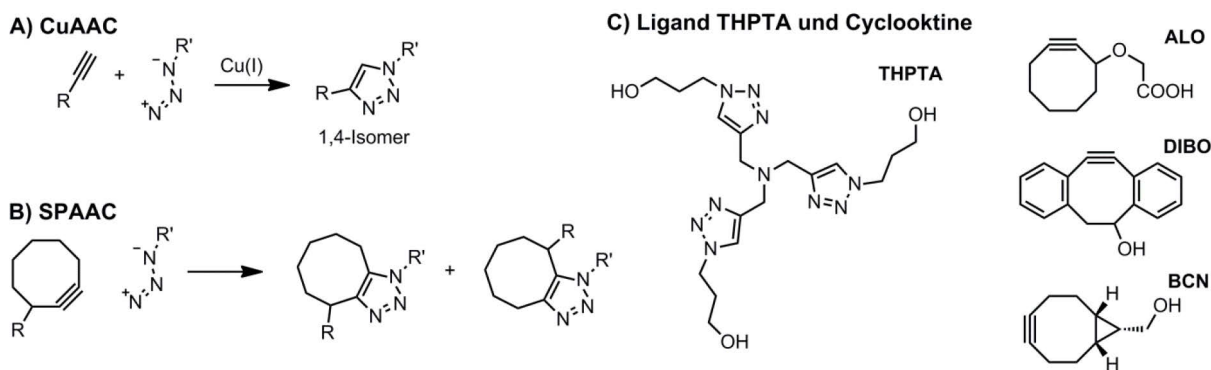


Abb. 15 A) CuAAC mit regioselektiver Produktbildung und B) SPAAC mit gespanntem Cyclooctin. C) Strukturen des verwendeten Liganden THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin) zur Stabilisierung der Cu(I)-Ionen und einige gängige gespannte Cyclooctine für die SPAAC.

Mit der SPAAC wurde eine Cu-freie Variante der [2+3]-Cycloaddition entwickelt, in welcher die Aktivierung der Alkinbindung durch das Einbringen in gespannte Cyclooctine erreicht wird. Da Reste von Cu(I) auf Zellen toxisch wirken können, ist diese Reaktion besonders in der zellulären Anwendung von Vorteil. Basierend auf den Beobachtungen von Wittig und Krebs im Jahr 1961, entwickelten Agard, Prescher und Bertozzi die ringspannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition zu einer biokompatiblen Konjugationsmethode weiter (Abb. 15B).^[47, 259] In Cyclooctinen, kann die Alkinbindung nicht linear vorliegen, wie es für eine sp-Hybridisierung ideal wäre, sondern liegt in einem Bindungswinkel von 163 ° vor.^[260] Dieser Grundzustand führt zu einer enormen Reaktionsbeschleunigung. Basierend auf dem Cyclooctingrundgerüst als kleinstem möglichen Alkinring, wurden verschiedene modifizierte Varianten mit gesteigerter Reaktivität vorgestellt (Abb. 15C).^[261-263] Für diese Arbeit wurde das Cyclooctin ALO (*aryless cyclooctyne*) gewählt, da es bereits Vorarbeiten im Arbeitskreis Seitz basierend auf dieser Variante gab und sich dieses Cyclooctin durch eine höhere Stabilität gegenüber anderen auszeichnet, was Vorteile in der HPLC-Reinigung und Lagerung ergibt.^[264]

Reaktive Sulfonateinheiten

Ein konvergenter Syntheseansatz erfordert die Herstellung der einzelnen Module: PNA, Peptid und reaktive Einheit. Sulfonate als reaktive Einheiten wurden in Anlehnung an die literaturbekannte Synthese aus der Gruppe um Hamachi *et al.* hergestellt (Abb. 16). Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen, reaktiven Sulfonylchlorid **4** wurde der Linker durch Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol erzeugt. Um die Sulfonate später für eine Azid-Alkin-Cycloaddition zugänglich zu machen, wurden Azidoalkohole wie die gezeigten Verbindungen **Y1 – 3** gewählt. Der Sulfonatlinker **5** ähnelt dabei den bekannten Linkersystemen und sollte als Ausgangspunkt der Untersuchungen dienen. Statt einer Aminogruppe am Ethoxyethanol wurde eine Azidfunktion eingeführt, indem das halogenhaltige Vorläufermolekül

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

mit Natriumazid in einer S_N^2 -Reaktion umgesetzt wurde. Die alternativen Linker **6** und **7** wurden auf dieser Grundlage so gestaltet, dass eine höhere Reaktivität zu erwarten wäre. Am Benzylsystem sollte der Übergangszustand bei der nukleophilen Substitution stabilisiert und damit die Reaktion begünstigt werden. Im Vergleich zu Linker **6** hat Linker **7** zusätzlich einen Substituenten mit -M-Effekt, welcher eine zusätzliche Reaktivitätserhöhung bewirken sollte.

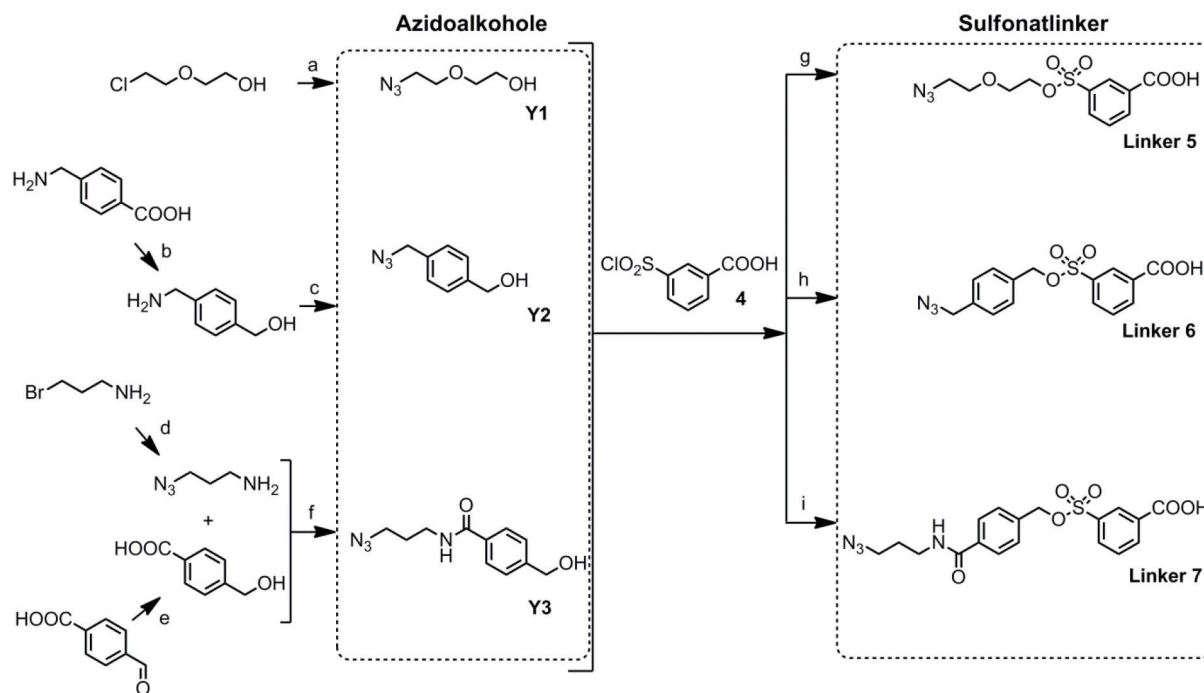


Abb. 16 Synthese der Sulfonatlinker **5** – **7** durch Verknüpfung des Sulfonylchlorids **4** mit den jeweiligen Azidoalkoholen **Y1** – **Y3**. Bedingungen und Ausbeuten: a) NaN_3 , H_2O , 17 h, Rückfluss, 60%; b) LiAlH_4 , THF, 16 h, 42%; c) Imidazolsulfonylazid, CuSO_4 , Na_2CO_3 , $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1 : 1), pH 8 – 9, 20 h, 77%; d) NaN_3 , H_2O , 14 h, Rückfluss, 40%; e) NaBH_4 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 3 h, 70%; f) EDC, HOBT, DIPEA, DMF, 19 h, 69%; g) Pyridin : DCM (1 : 3), $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 2 h, 47%; h) NEt_3 , DMF, 16 h, ca. 12% i) Pyridin : DCM (1 : 3), $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 18 h, 62%.

Synthese des Sulfonatlinkers **5**

Die Verknüpfung des Azidoalkohols **Y1** und des Sulfonylchlorids **4** zu Linker **5** ergab unter den beschriebenen Bedingungen ein Hauptprodukt und ein in der Normalphasenchromatographie schwer abtrennbares Nebenprodukt. Die Analyse über Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) legte nahe, dass es sich um ein Gemisch des Sulfonsäure- **5** und des Carbonsäureesters **8** handelte (Abb. 17A). Die massenspektrometrische Analyse zeigte mit $m/z = 316$ Übereinstimmung mit der erwarteten Produktmasse ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 316.3$) beziehungsweise deren Konstitutionsisomer. Über Umkehrphasenchromatographie wurden die Produkte getrennt und separat analysiert. Das Hauptprodukt bei einer Retentionszeit von 8 min erwies sich als gewünschtes Sulfonat, wie sich in der Infrarotspektroskopie und in NMR-Untersuchungen zeigte. Wurde ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen, so konnte bei Zugabe von Triethylamin, eine Verschiebung des Signals für den Carbonylkohlenstoff von 169.6 ppm zu 170.9 ppm

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

beobachtet werden, wie er für die Deprotonierung einer arylischen Carbonsäure zu erwarten wäre.^[265] Zudem zeigte das Infrarotspektrum eine starke Bande bei 1700 cm^{-1} . Diese kann der Carbonylstreckschwingung einer arylischen Carbonsäure zugeordnet werden, die üblicherweise bei $1700 - 1680\text{ cm}^{-1}$ auftritt.^[266] Entsprechende Carbonsäureester weisen hingegen höhere Wellenzahlen auf. Damit übereinstimmend wurde im Infrarotspektrum des Nebenprodukts, mit einer Retentionszeit von 13 min, eine starke Bande bei 1725 cm^{-1} gefunden.

Der so erhaltene Linker **5** wurde zunächst versuchsweise an ein kurzes Testpeptid mit der Sequenz GLAG an Sieber-Amid-Harz gekuppelt und abgespalten (Abb. 17B). Nachdem das Produkt **9** erfolgreich isoliert wurde, wurde analog die Kupplung am Volllängenpeptid durchgeführt und das Produkt **10** weiter in der CuAAC bzw. SPAAC eingesetzt.

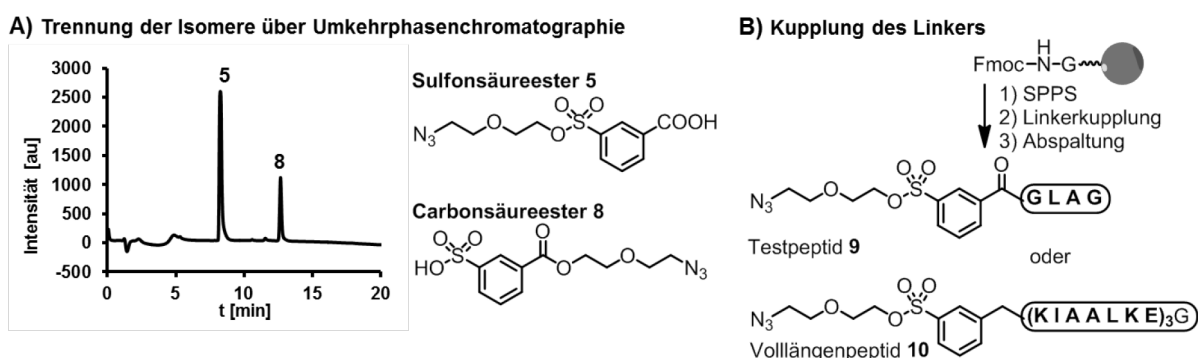


Abb. 17 Synthese und Testung von Linker **5**. A) Chromatogramm (Gradient: 30 – 90% Laufmittel B) der beiden Isomere: der gewünschte Sulfonsäureester **5** und der Carbonsäureester **8**. B) Synthese des Testpeptids **9** und des Volllängenpeptids **10** über SPPS (i) Entschützung: Piperidin : DMF (1 : 4), ii) Kupplung: 4 Äq. Fmoc-Aminosäure, 3.6 Äq. HCTU, 4 Äq. HOBT, 8 Äq. NMM, iii) Acetylierung: Essigsäureanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89)), anschließende Kupplung des Linkers (4 Äq. Linker, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. DIPEA) und Abspaltung (2% TFA, 2% TIS in DCM).

Synthese der alternativen Sulfonatlinker **6** und **7**

Der als besonders reaktiv eingeschätzte Linker **7** wurde nach beschriebenem Syntheschema hergestellt (Abb. 16). In einem ersten Versuch wurde wieder das kurze Testpeptid GLAG an Sieber-Amid-Harz aufgebaut und der Sulfonatlinker **7** unter Verwendung von PyBOP und DIPEA an den N-Terminus gekuppelt. Nach Abspaltung unter mild-sauren Bedingungen mit 2% TFA in DCM konnte das Produkt über HPLC-MS detektiert werden. Allerdings zeigte sich, dass ca. die Hälfte des Produkts bereits hydrolysiert vorlag. Dies ließ einerseits bereits auf eine hohe Reaktivität, aber andererseits auch auf eine hohe Labilität schließen. Trotz dieser Instabilität gegenüber Hydrolyse war es möglich, das Testpeptid mittels HPLC aufzureinigen und in einer SPAAC mit einer kurzen Cyclooctin-PNA zu testen. Nach 16 h konnte ein geringer Teil an Produkt gefunden werden. Der Versuch das System auf das K3-Volllängenpeptid zu übertragen, welches später als Donor fungieren sollte, erwies sich als noch schwieriger. Zwar konnte bei der Kupplung des Sulfonatlinkers **7** an das harzständige K3-Peptid an Sieber-Amid-Harz Produkt

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

gefunden werden, allerdings war bereits vor der Aufreinigung durch HPLC ein beträchtlicher Teil zum Sulfonsäurepeptid hydrolysiert. Es wurde abgeschätzt, dass eine derartig hohe Labilität in der Synthese, nicht nur zu sehr geringen Ausbeuten des PNA-Donor-Peptids führen würde, sondern vermutlich auch keinen Vorteil in der Anwendung in der Zellkultur bringen würde. Ist die Reaktivität des Linkers zu hoch, so ist zu befürchten, dass es zu einer hohen Hintergrundreaktivität unabhängig von der Coiled-Coil-Interaktion kommen kann.

Die Synthesebedingungen von Linker **6** wurden abgewandelt, da die Verwendung von Pyridin als Base nicht zum Produkt führte. Zu vermuten ist, dass sich analog zu den Untersuchungen von Christian Richter und Dr. Ulrike Reinhardt ein alkyliertes Pyridiniumsalz bildete, welches das Ergebnis eines nukleophilen Angriffs von Pyridin an dem intermediär gebildeten Produkt ist.^[253] Die Optimierung der Bedingungen mit alternativen nicht-nukleophilen Basen, wie Diisopropylethylamin (DIPEA) und Triethylamin in verschiedenen Konzentrationen zeigte, dass das Produkt bei Umsetzung in DMF mit Triethylamin gewonnen werden kann. Die hergestellte Menge war jedoch zu gering und die Reinheit nicht zufriedenstellend. In einem Testansatz wurde der Linker **6** mit PyBOP und DIPEA aktiviert auf das GLAG-Testpeptid an Sieber-Amid-Harz gegeben. Nach Reaktion über Nacht konnte jedoch kein Produkt in der HPLC-MS beobachtet werden. Nach den Erkenntnissen aus den Voruntersuchungen mit Linker **7** und dem Wissen über die Labilität des Linkers **6** schon in Anwesenheit von Pyridin, wurde geschlossen, dass beide Systeme nicht aussichtsreich sind.

Peptid- und PNA-Synthese

Die Synthese des K3-Peptids wurde nach Fmoc-Strategie an Sieber-Amid-Harz durchgeführt, da stark saure Abspaltbedingungen zur Solvolyse des Sulfonatlinkers **5** führen würden. Demnach mussten entsprechend auch die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren angepasst werden. Fmoc-geschütztes Lysin wurde mit einer Monomethoxytrityl(Mmt)- und Fmoc-Glutaminsäure mit einer 2-Phenylisopropyl(PhiPr)-Schutzgruppe verwendet. Diese können unter den Bedingungen der Peptidfreisetzung vom Harz mit 2% TFA zeitgleich entfernt werden.

Die PNA-Synthese wurde nach Fmoc-Strategie an TGR-Harz durchgeführt. Vor der Kupplung des ersten PNA-Monomers an das Harz wurde die Aminosäure Glycin angebracht, um als Abstandhalter vom Harz zu dienen (Abb. 18).

PNA-Oligomere, die zur Konjugation über CuAAC hergestellt wurden, wurden noch am Harz mit dem Alkin versehen. Hierfür wurden Propiolsäure **11** und Hexinsäure **12** getestet, um einen möglichen Einfluss des Abstands zum Peptid bzw. der Flexibilität zu untersuchen. Während Hexinsäure unter Verwendung von PyBOP und N-Mythylmorpholin (NMM) gekuppelt werden konnte, kam es im Fall von Propiolsäure zur Addition von Hydroxybenzotriazol an die Dreifach-

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

bindung, welche durch die Nähe zur Amidbindung aktiviert zu sein scheint. Bei Verwendung von Oxyma und Diisopropylcarbodiimid (DIC) unter basefreien Bedingungen konnte diese Nebenreaktion umgangen werden. Die entsprechenden Produkte wurden vom Harz abgespalten, gefällt und über HPLC aufgereinigt.

PNA-Oligomere für eine spätere Verwendung in der SPAAC wurden nach beendeter Synthese als 3mer- oder 6mer-Sequenzen mit freiem N-Terminus und als C-terminales Amid vom Harz abgespalten, gefällt und getrocknet. Unter Annahme nahezu quantitativer Abspaltung und unter Berücksichtigung des Ergebnisses des letzten *Fmoc-Monitorings* wurde das jeweilige Produkt in 1 μ mol-Aliquote unterteilt und diese zur Verknüpfung mit dem Cyclooctin ALO **13** (*arylless alkyne*, Abb. 13) mit Aktivierung durch DIC verwendet. Da die PNA-Oligomere bereits entschützt waren, konnte eine Nebenreaktion des aktivierten ALO mit den Aminen der Nukleobasen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Nach einer Stunde Reaktionszeit konnte jedoch in der HPLC-MS-Analyse die Umsetzung der PNA zu einem einzigen, neuen Produkt mit der Masse einer einfachen Konjugation mit ALO gefunden werden. Da dem primären, alkyischen Amin am freien N-Terminus die höchste Reaktivität eingeräumt wird, kann von dem gewünschten Produkt ausgegangen werden.

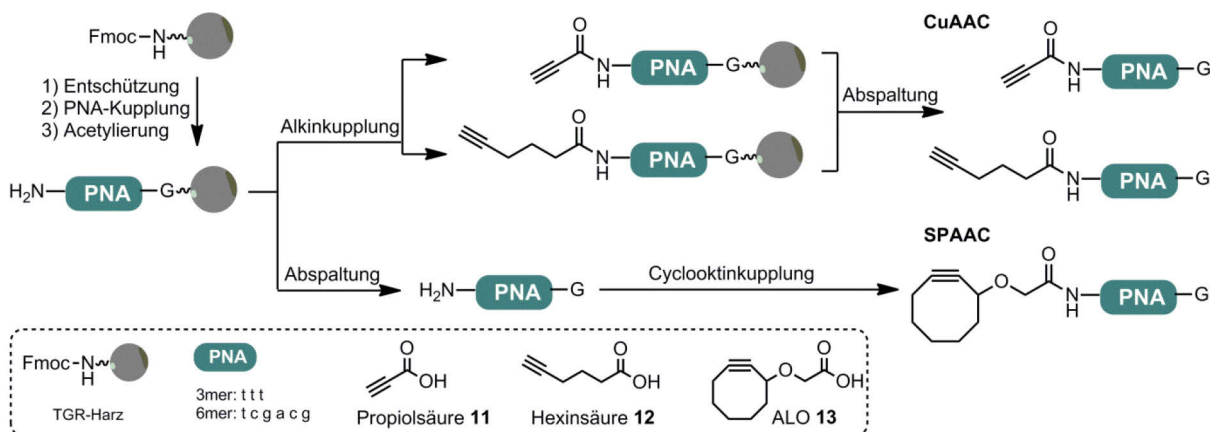


Abb. 18 Herstellung der PNA-Sequenzen über SPPS und Verknüpfung mit den Alkinen **11** oder **12** für die CuAAC oder Kupplung des Cyclooctins **13** in Lösung für eine anschließende SPAAC.

CuAAC

Die Konjugation von Alkin-PNA und Azidopeptid wurde über zwei Wege versucht: in Lösung (A-1) und an der festen Phase (A-2) (Abb. 19).

A-1 In Lösung: Wurden die aufgereinigten Ausgangsmaterialien in Puffer mit CuSO₄ und Natriumascorbat sowie dem Liganden THPTA zusammengegeben, so konnte selbst unter Variation der einzelnen Parameter, wie Konzentrationen und Zeit, in der HPLC-MS keine

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

Produktbildung beobachtet werden. Zwei mögliche Ursachen wurden in Betracht gezogen: i) Um die Reaktionslösung von Kupferionen zu befreien, wurden diese mit Natriumsulfid gefällt. Es ist nicht auszuschließen, dass es auch zur Präzipitation PNA-haltiger Verbindungen kam, da auch ein Absinken der Konzentration an PNA in der Lösung verzeichnet wurde. ii) Das PNA-Rückgrat enthält zahlreiche flexibel angeordnete Amide zusätzlich zu den Aminen und Amid-Gruppen der einzelnen Nukleobasen. Eine mögliche Komplexbildung der Kupferionen durch die PNA selbst würde die Reaktion beeinträchtigen. Diese Syntheseroute wurde nicht weiter verfolgt.

A-2 Feste Phase: Für erste Versuche zur Click-Reaktion an der festen Phase wurde das Testpeptid **9** (Abb. 17) verwendet. Dabei wurde das GLAG-Testpeptid nicht vom Harz gespalten, sondern nach Kupplung der reaktiven Einheit direkt der CuAAC unterzogen. Das Harz wurde gewaschen und nach der Abspaltung konnten das Linker-GLAG-Konjugat, dessen Hydrolyseprodukt und das Produkt in der HPLC-MS gefunden werden. Es wurden verschiedene Lösungsmittel (DMF, Tetrahydrofuran, H₂O und deren Gemische), Kupferquellen (CuBr, CuI, CuSO₄ mit Natriumascorbat) und Äquivalente getestet. Dazu wurden die Waschbedingungen so optimiert, dass die Hydrolyse möglichst gering ausfiel und Kupferreste gründlich entfernt wurden. Eine quantitative Ausbeute nach HPLC-Auswertung konnte mit dem Testsystem bei 1 Äq. Alkin-3mer-PNA, 4 Äq. DIPEA in CuI-gesättigter DMF-Lösung unter Argon über Nacht erreicht werden. Es wurde eine umfangreiche Abfolge an Waschschritten durchgeführt, die unter anderem die Verwendung von gesättigter 8-Hydroxychinolinolllösung beinhaltete. Durch Komplexbildung mit 8-Hydroxychinolinol sollten verbleibende Kupferionen entfernt werden. Analog wurden kupfer-katalysierte Cycloadditionen am Volllängenpeptid K3 vorgenommen. Hier wurden jedoch geringere Ausbeuten erzielt, da zum einen die Umsetzung nicht vollständig war und zum anderen eine Nebenreaktion beobachtet werden konnte. Vermutlich handelt es sich um eine Reaktion mit Iod, die bekanntermaßen auftreten kann, wenn das terminale Alkin zum 1-Iodalkin reagiert und im nachfolgenden Schritt das 5-Iodtriazol bildet.^[267, 268] Die entsprechende Masse konnte in der Untersuchung der Mischfraktionen aus der HPLC-Reinigung durch MALDI-TOF gefunden werden (siehe Abschnitt 7.2.2.3; gezeigt am Beispiel von Verbindung **16**). Dieses Nebenprodukt ist schwer abzutrennen und führte zu nochmals verminderten isolierten Ausbeuten von 0.2 – 1.2% bezogen auf das Harz. Ursächlich für die geringen Ausbeuten ist zudem die unvollständige Abspaltung vor allem längerer Peptide vom Sieber-Amid-Harz. Für das Volllängenpeptid konnten Abspaltungsausbeuten von teilweise nur 10% gefunden werden. Im Laufe der Arbeit wurden die Abspaltbedingungen optimiert, indem das Harz nach der Abspaltung mehrfach mit Acetonitril-H₂O-Gemisch (1:1) gewaschen wurde.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

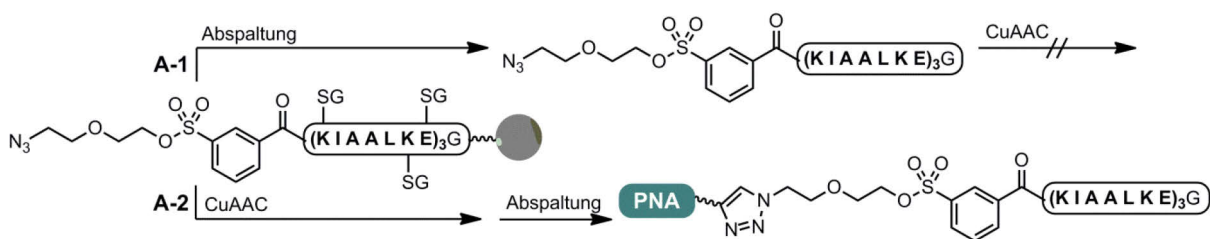


Abb. 19 Während über Route A-1 die gewünschten Donor-Konjugate nicht erzeugt werden konnten, waren sie über A-2, die CuAAC am Harz, zugänglich.

SPAAC

Die ringspannungsinduzierte [2+3]-Cycloaddition wird zumeist in wässrigen Puffersystemen durchgeführt. Da die Abspaltung vor allem großer Moleküle vom Sieber-Amid-Harz mit geringen Ausbeuten einherging, wurde bevorzugt die Durchführung der SPAAC in Lösung anvisiert. In einem ersten Versuch erfolgte die Verknüpfung der kurzen ALO-3mer-PNA mit dem Linker-K3-Peptid **10** in Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) in einer Stöchiometrie von 1 : 1 und 0.5 mM Konzentration der Reaktanden und führte bis zu 16% isolierter Ausbeute. Da diese Reaktion einfacher in der Handhabung und höher in der Ausbeute verlief, wurde die Konjugation über SPAAC anstelle der kupferkatalysierten Variante beibehalten. Auch wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit kein Unterschied in der Reaktivität in der angestrebten PNA-Transferreaktion im Vergleich zwischen den Donoren nach CuAAC- oder SPAAC-Synthese festgestellt (siehe Kapitel 4.1.3.1). Bei der Verknüpfung längerer Oligomere wurde in Acetonitril-Wasser-Gemischen gearbeitet, da längere PNA-Sequenzen zunehmend schlechtere Löslichkeit in rein wässrigen Puffern zeigten. Die SPAAC führte jeweils zur Bildung beider Regioisomere, die in der HPLC ein doppeltes Signal ergaben. Es wurde davon abgesehen die Isomere zu trennen, da kein Einfluss auf die spätere Anwendung angenommen wurde.

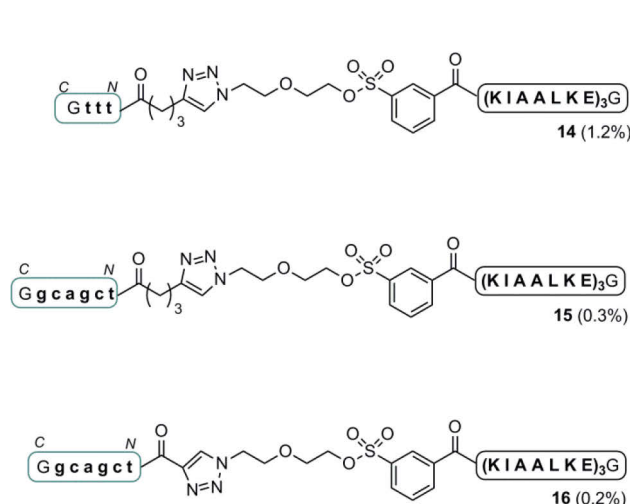
Hergestellte Konjugate und Fazit

Über CuAAC und SPAAC wurden die in Abb. 20 dargestellten Verbindungen hergestellt. Die SPAAC lieferte höhere Ausbeuten und war leichter in der Durchführung, sodass im weiteren Verlauf Konjugate über gespannte Cyclooctine synthetisiert wurden. Von den drei anvisierten Sulfonatlinkern **5** - **7** wurde nur Linker **5** für weitere Experimente verwendet, da die anderen bereits in der Synthese eine hohe Labilität zeigten. Allgemein sind die gezeigten Sulfonatverbindungen anspruchsvoll in der Handhabung, da saure Bedingungen, wie hohe Anteile an TFA, zur Solvolyse durch β -Eliminierung und basische Bedingungen zum nukleophilen Angriff wie im Fall der Pyridinadduktbildung führen. In reinem Wasser ist bereits bei Raumtemperatur die Hydrolyse des Sulfonsäureesters zu beobachten. Diese Labilität erschwert eine Optimierung

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

der Abspaltung des Peptids oder Konjugats vom Sieber-Amid-Harz. Neben den verschiedenen PNA-Längen (3- und 6-mer) wurde der Abstand der reaktiven Einheit zum Peptid moduliert. Hierfür wurde Verbindung **19** mit einer Amino-hexansäure(Ahx)-Einheit versehen, die eine höhere Flexibilität erlaubt.

A) PNA-Sulfonat-Donoren über CuAAC



B) PNA-Sulfonat-Donoren über SPAAC

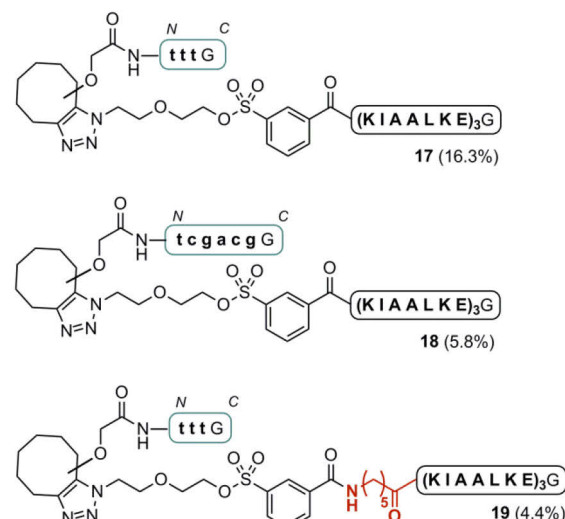


Abb. 20 Hergestellte PNA-Donoren unter Verwendung von Sulfonatlinker **5**. A) Über CuAAC gewonnene Verbindungen mit 3mer- und 6mer-Sequenzen. Die Ausbeuten beziehen sich dabei auf K3-Peptid-beladenes Harz. B) Über SPAAC gewonnene Verbindungen mit 3mer- und 6mer-Sequenzen und einer zusätzlichen, flexiblen Ahx-Einheit (rot). Es wurde jeweils beide Regioisomere erhalten. Die Gesamtausbeute wurde als Produkt der Sulfonatpeptidsynthese und der SPAAC ermittelt.

4.1.2.2) Thioester-basierte PNA-Peptid-Konjugate über SPAAC

Als Alternative zu Sulfonat-basierten Konjugaten wurden PNA-Donoren basierend auf Thioestern in Betracht gezogen, wie sie bereits von Reinhardt *et al.* verwendet wurden.^[77] Das dort vorgestellte Syntheschema wurde auf die Konjugation von PNA-Oligomeren adaptiert und die Thiole Mercaptopropionsäure (MPA) und Mercaptophenyllessigsäure (MPAA) als Bausteine verwendet, um die Geschwindigkeit in der Transferreaktion zu modulieren.

Synthese Thioester-basierter PNA-Donoren

Die Synthese Thioester-basierter PNA-Donoren wurde an Glycin-vorbeladenem TGR-Harz durchgeführt (Abb. 21). Das K3-Peptid wurde nach Fmoc-Strategie aufgebaut und die Mmt-geschützten Thiolbausteine gekuppelt. Nach Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe unter leicht sauren Bedingungen wurde der Thioester durch Verknüpfung des freien Thiols mit einer Azidocarbonsäure generiert. Die hier verwendete Azidohexansäure wurde durch Substitution mit Natriumazid aus Bromhexansäure hergestellt. Nach Befreiung des Peptidthioesters vom Harz wurde die SPAAC mit dem ALO-PNA-Oligomer in Lösung durchgeführt.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

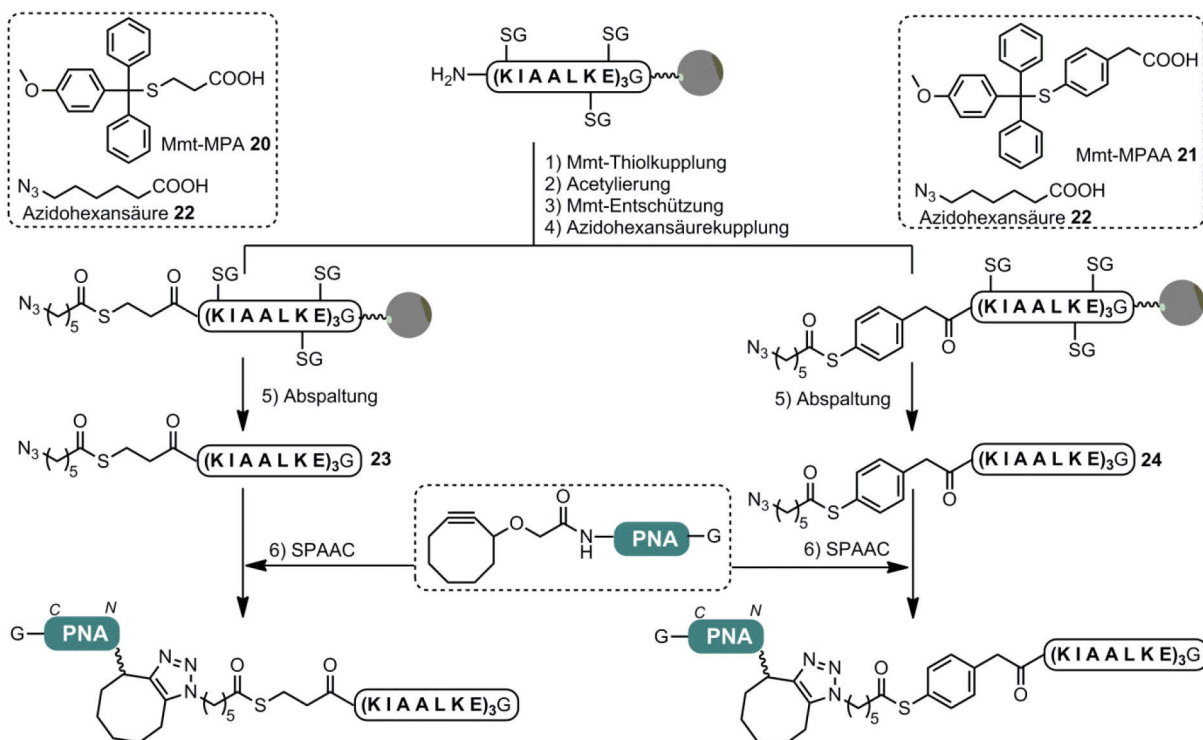
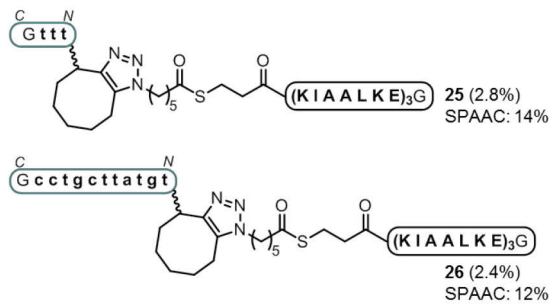


Abb. 21 Syntheschema Thioester-basierter PNA-Donoren mit MPA- oder MPAA-Verknüpfung. 1) 4 Äq. Mmt-Thiol, 3.6 Äq. HCTU, 8 Äq. NMM 2) Essigsäureanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89), 3) 2% TFA, 2% TIS in DCM, 4) 4 Äq. Azidohexansäure, 3.6 Äq. HCTU, 8 Äq. NMM 5) H₂O : TIS : TFA (2 : 2 : 96), 6) Alkin : Azid (1 : 1) in 0.5 – 1 mM Konzentration in ACN : H₂O (1 : 1 mit 1% TFA).

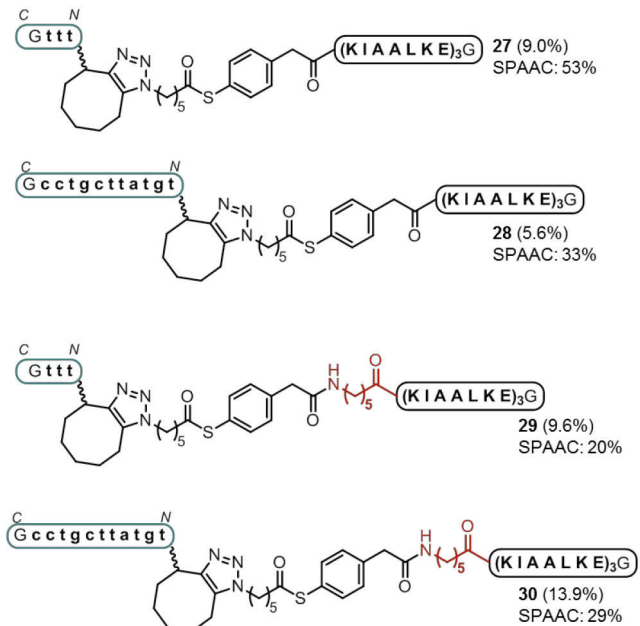
In Abb. 22 sind die PNA-Donor-Peptide gezeigt, die nach dem beschriebenen Syntheschema hergestellt wurden. Im Gegensatz zu den Sulfonat-basierten Donoren wurde als längere PNA-Sequenz ein 11mer- anstelle eines 6mer-Oligomers gewählt. Dies sollte eine stabilere Hybridisierung am komplementären DNA- oder PNA-Strang gewährleisten. Die Stabilität eines Oligonukleotid-Duplex' lässt sich durch die Schmelztemperatur beschreiben - die Temperatur, bei der 50% des Doppelstrangs denaturiert ist. Durch die Hyperchromizität von DNA- und PNA-Strängen, also den Anstieg der Absorption bei Denaturierung, lässt sich die Schmelztemperatur T_M (melting temperature) aus der Absorptionsmessung bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmen. Der PNA(11)·DNA(11)-Duplex (Abb. 22C) ergab einen Wert von $T_M = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$, während für die kürzere 6mer-Sequenz bei Messung im Temperaturbereich von 22 – 90 °C keine Schmelztemperatur messbar war. Zusätzlich zu den zwei verschiedenen Thiolen, MPA und MPAA, und den beiden Sequenzlängen, 3mer und 11mer, wurden auch Varianten mit und ohne Ahx-Einheit zur Erhöhung der Flexibilität hergestellt. Die in Klammern angegebenen Ausbeuten der hergestellten Donoren **25** – **30** beziffern die Gesamtausbeute als Produkt der Thioesterpeptidsynthese und der SPAAC. Die Ausbeuten der Umsetzung der jeweiligen ALO-PNA mit dem Azido-K3-Peptid bewegten sich zwischen 12 – 53%. In Abb. 22D sind exemplarisch Chromatogramme und Massenspektren zu den Donoren mit der 3mer-PNA-Sequenz ttt gezeigt.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

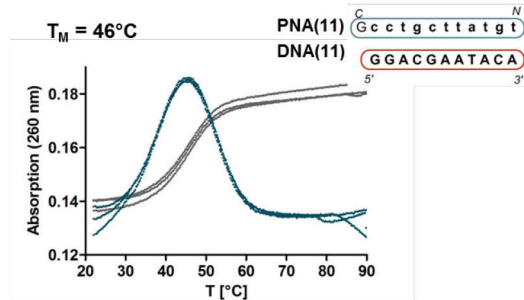
A) MPA-Thioester



B) MPAA-Thioester



C) Schmelztemperaturmessung



D) Chromatogramme und MALDI-TOF-Spektren zu PNA(3mer)-Donoren

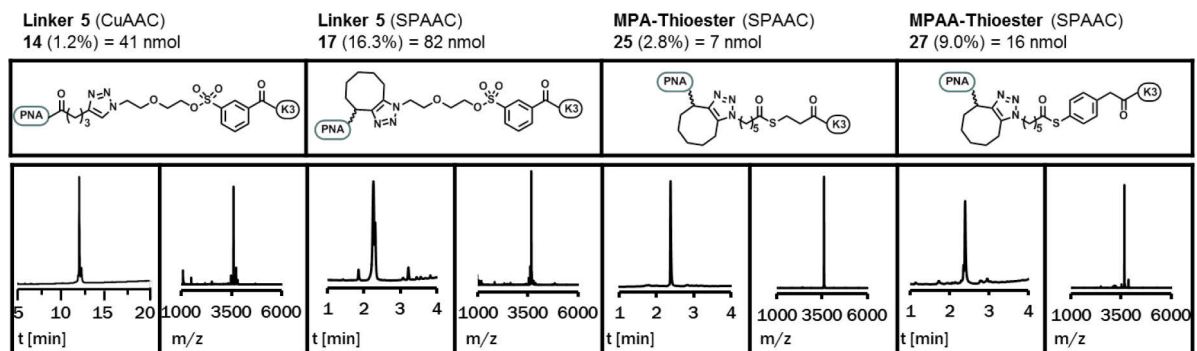


Abb. 22 Hergestellte PNA-Donor-Peptide mit Thioesterverknüpfung. A) MPA-basierte Thioester mit kurzer (PNA(3)) und langer (PNA(11)) Sequenz. B) MPAA-basierte Thioester mit kurzer (PNA(3)) und langer (PNA(11)) Sequenz jeweils mit und ohne Ahx-Einheit (rot). Die geschwungene Bindung fasst die entstandenen 1,4- und 1,5-Isomere zusammen. C) Schmelztemperaturbestimmung der verwendeten 11-Monomer-langen PNA(11) mit der komplementären DNA(11). Verlauf der Absorption (grau) und die erste Ableitung (blau). Bedingungen: 1 μM Oligonukleotid in Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0). D) Analytische Daten zu Donor-Verbindungen mit der 3mer-Sequenz ttt: Verbindung **14** (HPLC-FL/D: Gradient 20 – 60% Laufmittel B in 20 min, Detektion bei 224 nm; MALDI-TOF: $M_{\text{berechnet}} = 3600.11 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gefunden}} = 3600 [M+H]^+$), Verbindung **17** (UPLC-MS: Gradient 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm; MALDI-TOF: $M_{\text{berechnet}} = 3670.20 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gefunden}} = 3670 [M+H]^+$), Verbindung **25** (UPLC-MS: Gradient 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm; MALDI-TOF: $M_{\text{berechnet}} = 3600.19 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gefunden}} = 3602 [M+H]^+$), Verbindung **27** (UPLC-MS: Gradient 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm; MALDI-TOF: $M_{\text{berechnet}} = 3662.27 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gefunden}} = 3666 [M+H]^+$).

Wie bei den Sulfonat-basierten Konjugaten, ist auch hier der N-Terminus der PNA mit dem N-Terminus des Peptids verknüpft. Obwohl die Orientierung in ersten Transferexperimenten nicht ausschlaggebend sein sollte, so könnte die Möglichkeit, auch eine lineare Anordnung, also die Verknüpfung des PNA-C-Terminus mit dem Peptid-N-Terminus, zu erlauben für spätere Anwendungen günstig sein. Gerade in Fällen, in denen die übertragene PNA als Bindeglied

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

zweier sterisch anspruchsvoller Moleküle dient, kann die Orientierung relevant sein. Ein Synthesansatz über die Anbindung von ALO nicht am N-Terminus, sondern über ein C-terminales Lysin sollte derartige PNA-Donoren zugänglich machen (Abb. 23). Wird der N-Terminus der PNA acetyliert, so ist das ϵ -Amin des Lysins das reaktivste primäre Amin des PNA-Oligomers und kann nach Verknüpfung mit ALO und anschließender SPAAC die linearen PNA-Donoren **34** und **35** liefern. In Verbindung **34** wurde mit einer 11mer-, in **35** mit einer 16mer-PNA-Sequenz gearbeitet. Eine weitere Erhöhung der Schmelztemperatur durch die Verlängerung der Sequenz sollte später noch stabilere Doppelstränge ausbilden.

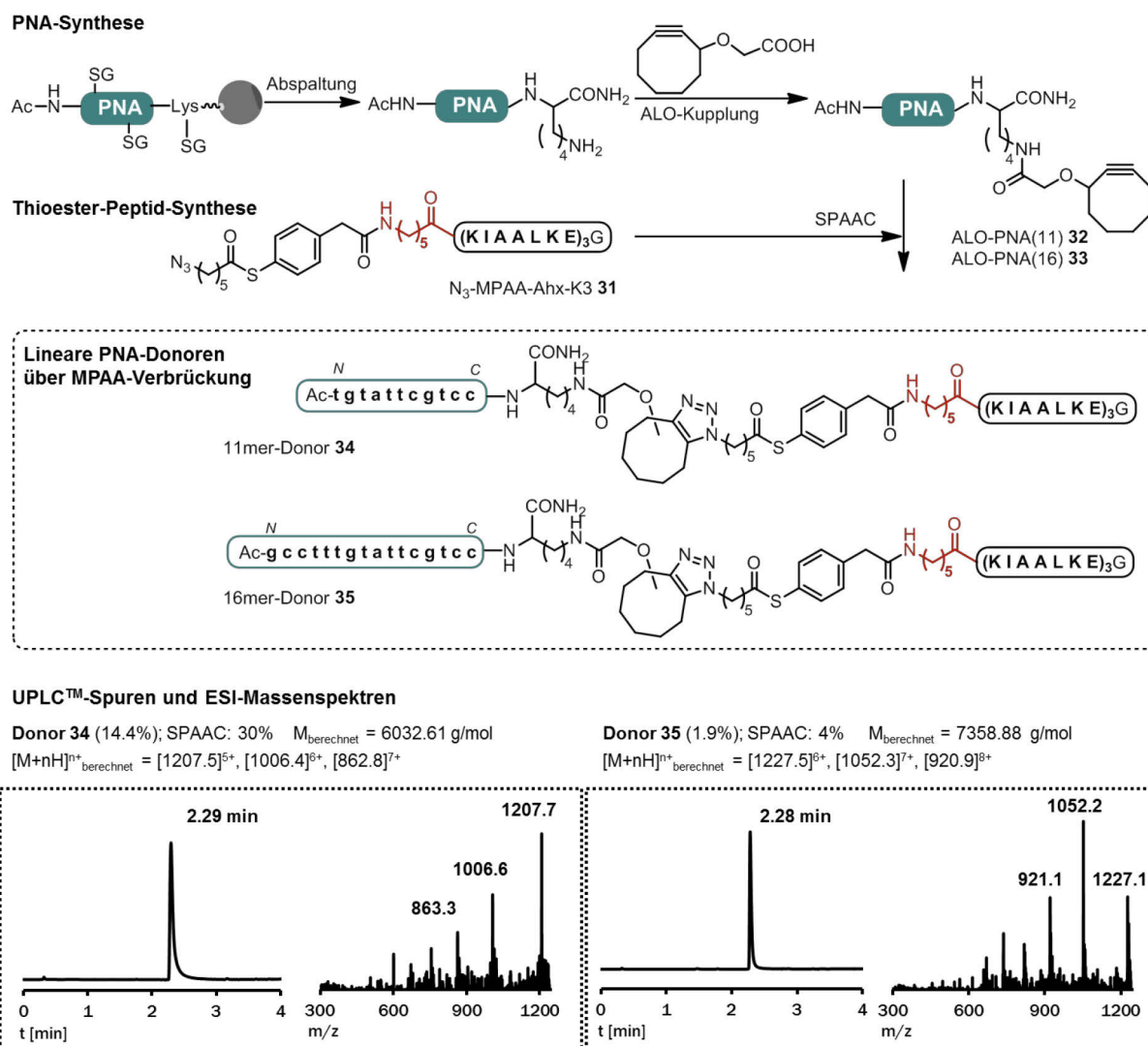


Abb. 23 Synthese linearer PNA-Donoren auf Basis von MPAA-Thioestern mit Aminohexansäureeinheit (Ahx, rot). SG – Schutzgruppe. Analytische Daten zu Verbindung **34** und **35** (UPLC-MS: Gradient 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm).

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

4.1.3) Transferexperimente

Die hergestellten PNA-Donoren sollten auf ihre Anwendbarkeit in einem Sulfonat-vermittelten Alkyltransfer oder einem Thioester-vermittelten Acyltransfer untersucht werden (Abb. 24). Hierfür wurde das zu K3 komplementäre E3-Peptid über Fmoc-Strategie an der festen Phase hergestellt und am N-Terminus mit Cystein versehen. Für den Sulfonat-vermittelten Transfer wurde zudem eine Variante mit nachfolgendem Glycin hergestellt, um auch die Zugänglichkeit interner Cysteine zu überprüfen. Die Transferreaktionen wurden jeweils in Phosphatpuffer (100 mM Na_2HPO_4 , 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphan (TCEP)) durchgeführt und durch Zugabe von 2% TFA die Reaktion beendet. Unter sauren Bedingungen ist die Cysteinseitenkette vollständig zum Thiol protoniert und hat damit eine geringere Tendenz nukleophil zu reagieren. Die Anwesenheit von TCEP im Reaktionspuffer sollte die Bildung von Disulfiden zwischen zwei Cysteinresten verhindern. Ein Aliquot der jeweiligen Reaktionslösung wurde anschließend über HPLC oder UPLCTM analysiert.

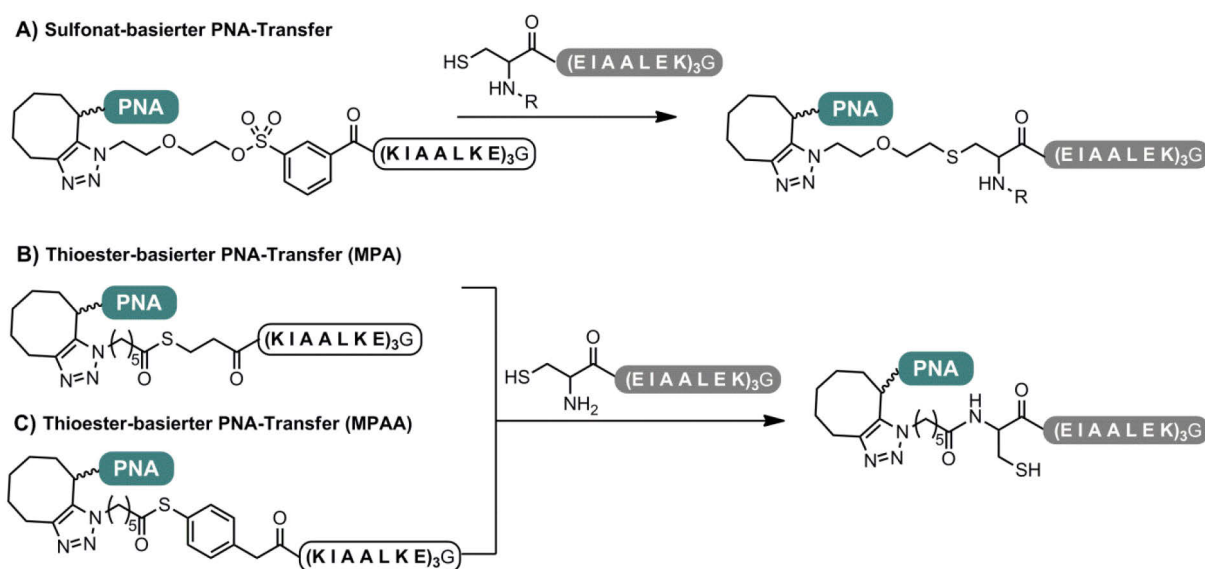


Abb. 24 Schema der Alkyl- und Acyltransferreaktionen. A) Sulfonat-basierter Alkyltransfer auf terminale ($R = \text{H}$) und interne ($R = \text{Gly}$) Cysteine am E3-Peptid. B) Thioester-vermittelter Acyltransfer auf Basis von MPA. C) Thioester-vermittelter Acyltransfer auf Basis von MPAA.

4.1.3.1) Sulfonat-basierter Alkyltransfer von PNA

In ersten Experimenten zum Sulfonat-vermittelten Transfer sollte gezeigt werden, ob PNA-Oligomere durch ein Coiled-Coil-basiertes System übertragen werden können. Des Weiteren sollte der Einfluss der PNA-Länge, des pH-Werts und mögliche Unterschiede durch die Konjugationsmethode, CuAAC oder SPAAC, untersucht werden. Das Akzeptorpeptid **36** wurde in 5 μM Konzentration vorgelegt und mit Zugabe eines Äquivalents des jeweiligen Donor-Konjugats die Reaktion gestartet (Abb. 25). Nach Umsetzung über 18 h wurden die Reaktionslösungen mit

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

TFA versetzt, kalt gestellt und anschließend analysiert. Die Konzentration von 5 μM wurde gewählt, um einerseits in einer möglichst geringen Konzentration zu arbeiten, die die Selektivität auf Grundlage der Coiled-Coil-Interaktion gewährleistet und andererseits noch eine ausreichend hohe Signalintensität in der Analyse über HPLC erzeugt. Je höher die Konzentration der Reaktanden ist, umso eher kommt es zu einer unspezifischen Transferreaktion, die nicht durch die Coiled-Coil-Wechselwirkung initiiert ist. Die Detektion während der HPLC erfolgte einmal bei 224 nm, womit alle Substanzen mit einer Amidbindung sichtbar sind und einmal bei 260 nm. In letzterem Fall sind nur PNA-haltige Verbindungen zu sehen, da die Donoren K3 und E3 keine aromatischen Aminosäuren beinhalten. Die Produktbildung wurde massenspektrometrisch über Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) verifiziert und über die Integration der Produktflächen bei 260 nm quantifiziert. Da die PNA-Oligomere mit $\epsilon_{3\text{mer}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ und $\epsilon_{6\text{mer}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ weit höhere Extinktionskoeffizienten bei 260 nm haben, als der Sulfonatlinker, wurde dieser vernachlässigt und die Produktausbeute direkt über das Verhältnis der Flächenintegrale von Edukt und Produkt bestimmt.

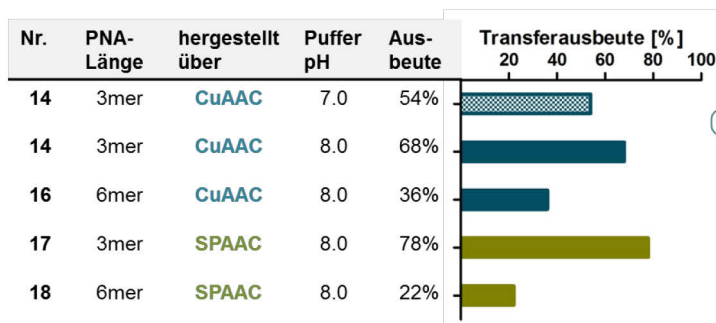
Initiale Experimente zum Sulfonat-basierten PNA-Transfer

Der PNA-Donor **14** wurde zum einen in einer Transferreaktion bei pH 7.0 und zum anderen bei pH 8.0 eingesetzt. Bei höherem pH-Wert konnte eine gesteigerte Ausbeute von 68% gegenüber 54% Produkt bei pH 7.0 nach 18 h Reaktionszeit beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass bei pH 8.0 ein größerer Anteil der Thiole als Thiolate vorliegt, was zu einer gesteigerten Reaktivität führt. In Abb. 25 sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengetragen. Wurde anstelle der 3mer- die 6mer-Sequenz übertragen, so sank die Transferausbeute um fast die Hälfte. Zum Vergleich mit der SPAAC sind in Abb. 25A auch die Ausbeuten für den Transfer mit Donor **17** und **18** nach 22 h angegeben, die über UPLCTM bestimmt wurden (grüne Balken). Hier sank die Ausbeute von 78% auf 22%, wenn statt der 3mer- die 6mer-Sequenz übertragen wurde. Allgemein zeigte sich, dass:

- i) eine neue Verbindung, mit dem für das Produkt errechneten Molekulargewicht gebildet wurde
- ii) ein höherer pH-Wert von 8.0 gegenüber 7.0 für die Reaktion von Vorteil ist
- iii) längere PNA-Stränge weniger effizient übertragen werden, als kürzere
- iv) die Ausgangsverbindungen im betrachteten Zeitraum weiterhin stabil sind (d.h. keine Hydrolyse des Sulfonatlinkers)
- v) die Konjugate aus CuAAC und SPAAC keine starken Unterschiede im Transfer zeigen, sodass im weiteren Verlauf mit den Verbindungen aus der SPAAC gearbeitet wurde, deren Synthese leichter in der Handhabung war und höhere Ausbeuten lieferte.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

A) Ausbeuten der Alkyltransferreaktion



B) Alkyltransfer mit Donor 14

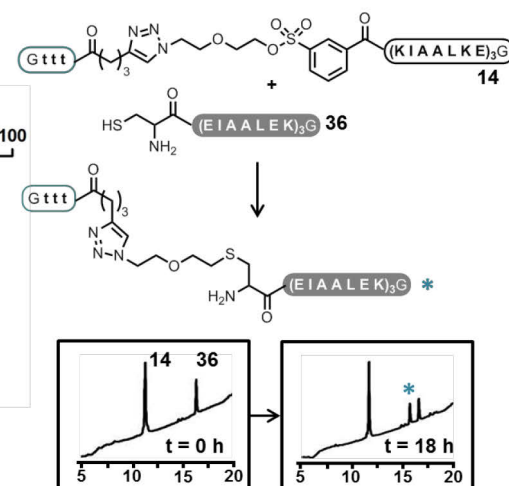


Abb. 25 Ergebnisse der Transferreaktionen über Sulfonat-basierte Donoren. A) Ausbeuten der Alkyltransferreaktion in pH 7.0 (kariertem Balken) oder pH 8.0, mit verschiedenen PNA-Längen (3- oder 6mer) und Verbindungen aus CuAAC nach 18 h (blaue Balken) und SPAAC nach 22 h Reaktionszeit (grüne Balken). B) Beispielhaftes Chromatogramm bei 224 nm bei den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 18$ h bei pH 8.0 (Gradient: 20 – 90% Laufmittel B in 30 min; Stern – Produkt).

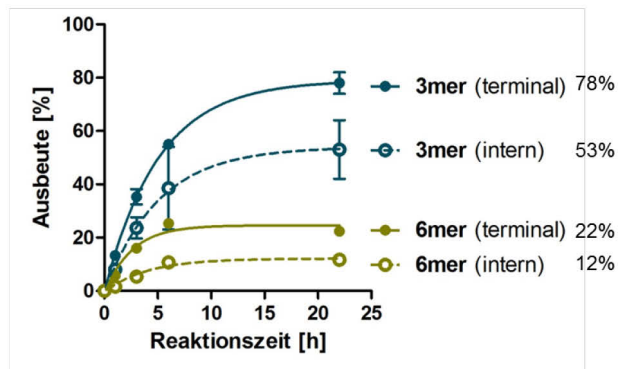
Zeitabhängige Untersuchungen zum PNA-Transfer über Sulfonate

Weitere Experimente, in denen nun der zeitliche Verlauf der Reaktion näher untersucht werden sollte, wurden bei pH 8.0 durchgeführt und über UPLC™ analysiert, welche kürzere Laufzeiten für eine Trennung benötigt. Neben dem zeitlichen Verlauf des Alkyltransfers auf das Akzeptorpeptid **36** mit einem terminalen Cystein, wurde auch der PNA-Transfer auf das Peptid **37** mit einem internen Cystein getestet (Abb. 26C). Bei jeder Dreifachmessung wurde die Produktbildung über MALDI-TOF überprüft und die Integrale der Signale bei 260 nm ausgewertet. In Abb. 26A sind die Produktausbeuten gegen die Reaktionsdauer aufgetragen und als Reaktion pseudo-erster Ordnung genähert (siehe Kapitel 6.4.1). Die Annahme einer pseudo-ersten Ordnung ergibt sich aus der induzierten Proximität der reaktiven Einheiten durch die Coiled-Coil-Peptide.^[269] Die Übertragung kürzerer PNA-Stränge ergibt höhere Ausbeuten als im Fall von langen PNA-Oligomeren (blaue und grüne Kurve). Auch der Transfer auf terminale anstelle von internen Cysteinen führt zu mehr Produktbildung. Es ist dabei zu betonen, dass eine Übertragung auf interne Cysteine durch Sulfonat-vermittelten Alkyltransfer wie gewünscht möglich ist (Kreise). Die Ausbeuten an PNA-E3-Konjugat nach 22 h liegen in Abhängigkeit von der PNA-Länge und dem Akzeptor zwischen 12 – 78%. Erstaunlicherweise kommt die Reaktion nach ca. 6 – 20 h zum Erliegen, obwohl noch nicht umgesetztes Donorkonjugat in Lösung vorliegt. Die Ursache wurde nicht näher untersucht, aber da vor allem längere PNA-Sequenzen den Transfer zu erschweren scheinen, könnte eine Abschirmung der reaktiven Einheit oder

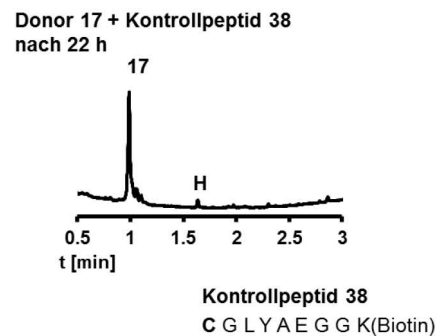
4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

Aggregation durch PNA-Oligomere eine Rolle spielen. Insgesamt konnten die Transferreaktionen von PNA auf terminale und interne Cysteine erfolgreich realisiert werden. Wesentlich ist dabei, dass in dem Fall, dass das Cysteiny-E3-Peptid durch ein anderes willkürlich gewähltes Cysteiny-Peptid **38** ausgetauscht wurde, keine Reaktion zu beobachten war (Abb. 26B). Das belegt die Selektivität der Transferreaktion unter den gegebenen Bedingungen. Da es für die Arbeit in biologischen Systemen erwünscht ist, dass Reaktionen möglichst schnell, bestenfalls in einigen Minuten, stattfinden, wurde im Folgenden eine Optimierung der Donoren und Akzeptoren vorgenommen.

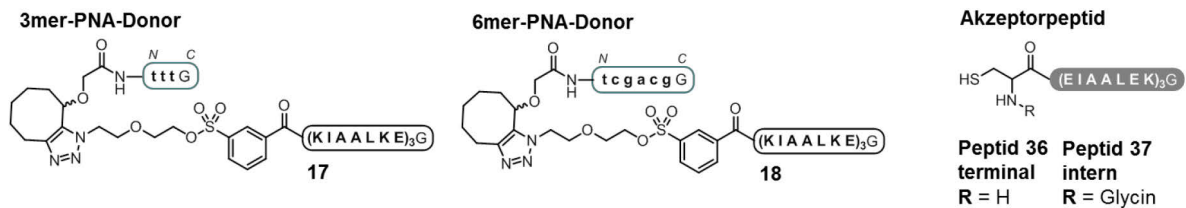
A) PNA-Transfer in Abhängigkeit von der Zeit



B) Kontrollmessung über UPLC™



C) Donoren und Akzeptoren



D) UPLC™-Spuren zur zeitabhängigen Untersuchung des PNA-Transfers

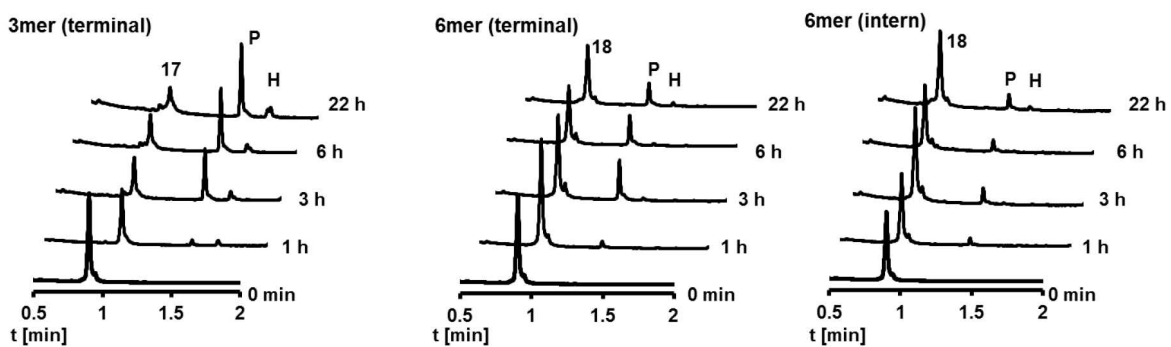


Abb. 26 Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit. A) Produktausbeute für den Transfer von 3mer- (durch Donor **17**) oder 6mer-PNA (durch Donor **18**). Als Akzeptorpeptide wurden Peptid **36** (terminal) oder **37** (intern) verwendet. Bedingungen: 5 μ M Peptide in 100 mM Na_2HPO_4 , 1 mM TCEP, pH 8.0. Die Messwerte wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 durch eine Funktion gefittet. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. B) Bei Zugabe von Kontrollpeptid **38** zu Donor **17** wurde unter den Transferbedingungen nach 22 h keine Übertragung von PNA beobachtet. Gradient: 20 – 90 % Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm. C) Verwendete Donoren und Akzeptoren. D) Exemplarische UPLC™-Spuren, wie sie zur Bestimmung der Produktbildung verwendet wurden. Gradient: 20 – 90 % Laufmittel B in 4 min, Detektion bei 260 nm. P – Produkt, H – hydrolysierte PNA.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

Eine Möglichkeit die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen wurde darin gesehen, die reaktiven Einheiten besser zu positionieren. Dabei kann eine Erhöhung der Flexibilität von Vorteil sein. Zu viel Flexibilität hingegen kann wiederum den positiven Effekt der Templatkontrolle schmälern. Ein Abstandhalter, sowohl am Donor als auch am Akzeptor, wurde getestet (Abb. 27). Im Fall des Donors wurde eine Aminohexansäureeinheit (Ahx) zwischen dem Linker und dem Peptid eingefügt. Da das Akzeptorpeptid künftig exprimierbar sein sollte, wurden zwei Glycineinheiten verwendet. Dieser neue Donor **19** und der Akzeptor **39** wurden auf ihre Reaktivität untersucht (Abb. 27). Es zeigte sich eine deutlich höhere Reaktivität bei Einbau einer zusätzlichen Ahx-Einheit (Abb. 27A, rot) im Vergleich zum unmodifizierten Donor (blau). Im Gegenteil dazu verschlechterte sich die Transferausbeute, wenn der Akzeptor um zwei Glycineinheiten ergänzt wurde (Abb. 27B). Auch bei Kombination von Ahx-haltigem Donor mit verlängertem Akzeptor (grau) war die Transferreaktion deutlich vermindert. Die Relevanz einer guten Positionierung der reaktiven Einheiten und der Vorteil eines zusätzlichen Ahx-Bausteins werden aus diesen Experimenten deutlich.

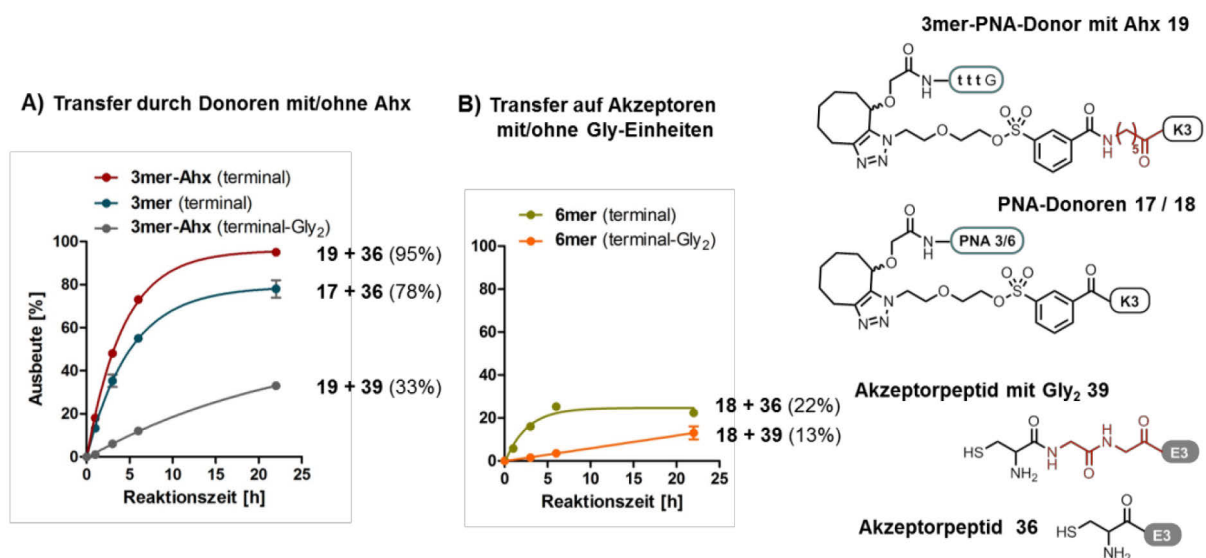


Abb. 27 Transferreaktionen mit modifizierten Donoren und Akzeptoren. A) Vergleich der Transferreaktionen mit (rot, **19** + **36**) und ohne Ahx-Einheit (blau, **17** + **36**) bzw. mit Ahx- und Gly₂-Abstandhalter (grau, **19** + **39**). B) Vergleich der Reaktivität einer 6mer-PNA **18** mit C-E3 (grün, **36**) und C-GG-E3 (orange, **39**). Bedingungen: 5 µM Peptide in 100 mM Na₂HPO₄, 1 mM TCEP, pH 8.0.

Schlussfolgerungen

Es konnte gezeigt werden, dass Sulfonat-verknüpfte PNA-Peptid-Konjugate in der Lage sind, einen PNA-Strang von einem Donor- auf ein Akzeptorpeptid zu übertragen. Diese Reaktion läuft selektiv ab und kann durch eine zusätzliche Ahx-Einheit beschleunigt werden. Eine weitere Beschleunigung des PNA-Transfers für die zelluläre Anwendung ist allerdings wünschenswert, damit innerhalb von Minuten PNA-Protein-Konjugate erzeugt werden können.

4.1.3.2) Thioester-basierter Acyltransfer von PNA

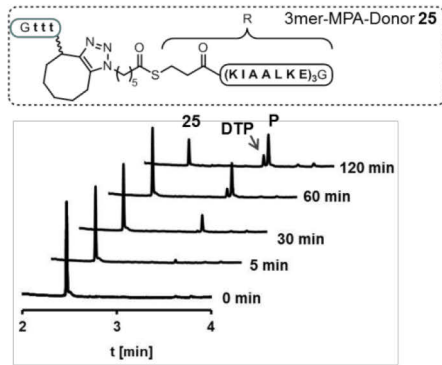
Bei den Versuchen zu templatbeschleunigten Reaktionen mithilfe Thioester-verknüpfter Donoren wurde in TCEP-haltigem Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄, 1 mM TCEP) bei pH 7.0 gearbeitet. Ein höherer pH-Wert kann zur Hydrolyse des Donors führen. Um eine unspezifische Hintergrundreaktion trotz zu erwartender gesteigerter Reaktivität zu vermeiden, wurden die Peptidkonzentrationen von zuvor 5 µM auf 2.5 µM gesenkt. Anstelle einer 6mer- wurde eine 11mer-Sequenz übertragen.

Transfer durch MPA-verknüpfte PNA-Donoren

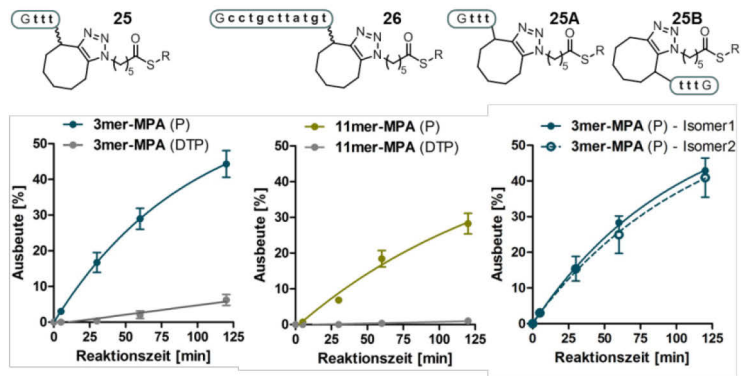
Erste Transferexperimente wurden mit dem weniger reaktiven MPA-Thioester durchgeführt. Beispielhaft sind in Abb. 28A die Chromatogramme für die Übertragung der 3mer-Sequenz von Donor **25** auf das Cysteiny-E3-Peptid **36** gezeigt. Neben der Entstehung des gewünschten Transferprodukts **P** konnte eine weitere neu gebildete Verbindung beobachtet werden. Die UPLCTM-MS-Analyse legte nahe, dass es sich um ein Nebenprodukt aus dem Transfer zweier PNA-Einheiten auf ein Akzeptorpeptid handelt (Abb. 28C). Diese Verbindung wird gebildet, wenn das Produkt **P** eine weitere Transferreaktion eingeht. Das ist möglich, da zum einen weiterhin eine Affinität zwischen dem K3- und E3-Peptid besteht und zum anderen das Thiol durch die S→N-Acylumlagerung wieder für einen nukleophilen Angriff zur Verfügung steht. Das gebildete doppelte Transferprodukt (**DTP**) ist wiederum ein Thioester und kann zum Produkt **P** und einem frei werdenden PNA-Strang hydrolysieren (vergleiche Kapitel 4.4). Diese Nebenreaktion ist in der Hinsicht nicht als nachteilig zu bewerten, als dass das entstehende Molekül **DTP** die gewünschte PNA-Markierung kovalent trägt, was in der späteren Anwendung entscheidend ist. Die Signale in den Chromatogrammen bei 260 nm wurden integriert und die ermittelten Integrale über die Extinktionskoeffizienten zu einander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung über die Extinktionskoeffizienten ist entscheidend, da **DTP** eine doppelt so hohe Absorption aufweist, wie die Ausgangsverbindung oder das Produkt **P**. In Abb. 28B sind die Ausbeuten an Produkten **P** und **DTP** gegen die Zeit aufgetragen. Der Anteil an **DTP** ist in beiden Fällen gering. Wie beim Sulfonat-vermittelten Transfer bereits beobachtet, beeinflusst die Länge der PNA die Reaktivität. Trotz der Länge von elf Monomeren, konnten nach 2 h Reaktionszeit bereits moderate Ausbeuten von ca. 30% erzielt werden. Bei der Synthese des Donors **25** mit einer 3mer-PNA-Sequenz war es möglich, die aus der SPAAC hervorgehenden 1,4- und 1,5-Regioisomere über HPLC zu trennen und in ihrer Anwendbarkeit für den PNA-Transfer zu vergleichen (Abb. 28B). Wie zu erwarten, zeigte die unterschiedliche räumliche Anordnung keinen Einfluss auf die Übertragungsgeschwindigkeit oder -ausbeute.

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

A) Chromatogramme zum Transfer mit Donor 25



B) Zeitlicher Verlauf MPA-vermittelter Transferreaktionen



C) Reaktionsverlauf

Transferreaktion

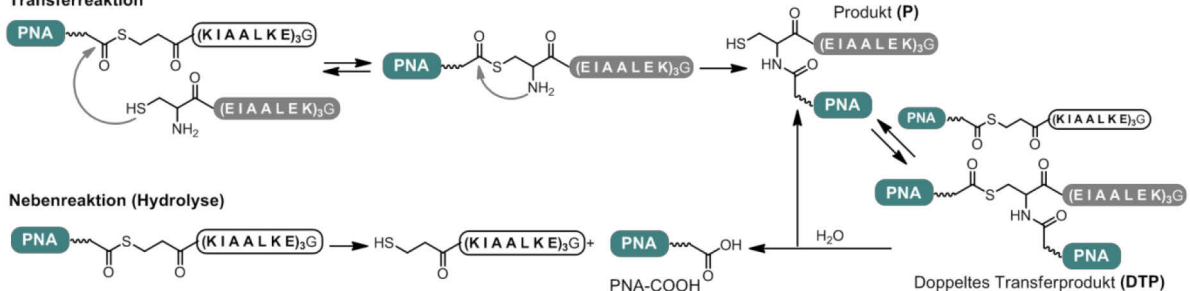


Abb. 28 Transferexperimente mit MPA-basierten Donoren. A) Chromatogramme bei 260 nm für den Transfer ausgehend vom Donor-Konjugat **25** (Gradient: 0 – 60% Laufmittel B). B) Transferausbeuten für die Übertragung einer 3mer- (links) oder 11mer-Sequenz (Mitte). Vergleich der Transferausbeuten der beiden Regioisomere (rechts). C) Reaktionen, die zu den beobachteten Produkten **P** und **DTP** führen.

Transferexperimente mit MPAA-Verknüpfung

Die Thioesterpeptide mit MPAA-Verknüpfung wurden in kürzeren Reaktionszeiten untersucht, da arylische Thioester reaktiver sind als alkyliche. Die Bedingungen wurden analog der Untersuchungen zu MPA-Thioestern gewählt und die Resultate in Abb. 29 zusammengefasst. Die Auswertung der Flächenintegrale bei 260 nm wurde unter Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Verbindungen vorgenommen und neben der Absorption der PNA-Sequenzen jene der MPAA-Einheit mit einbezogen. Es zeigte sich, dass eine 3mer-PNA-Sequenz durch dieses Donorsystem bereits nach 2 min beinahe quantitativ auf das Akzeptorpeptid Cysteinyl-E3 **36** übertragen werden konnte. Auch hier wurde das Nebenprodukt **DTP** gefunden, allerdings nur in geringem Maße. Auch die Übertragung der 11mer-Sequenz war nach ca. 2 min beendet und erreichte eine Ausbeute von 40%. Das jeweilige Thioester-Konjugat war zum Ende der Reaktionsbeobachtung bei 10 min vollständig aufgebraucht. Im Fall des längeren Oligomers entfielen 40% auf Produkt **P** und ca. 30% auf das Nebenprodukt **DTP**, welches zwei PNA-Stränge trägt. Auf das Akzeptorpeptid **36** bezogen bedeutet dies, dass 70% markiert wurden. Diese Ergebnisse sind in Hinblick auf eine Anwendung als zelluläre Markierungsmethode sehr vielversprechend. Ergänzend wurde untersucht, ob eine flexible Ahx-Einheit, wie sie sich schon in der Anwendung an Sulfonat-basierten Donoren als vorteilhaft erwies, auch hier einen

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

positiven Einfluss auf die Reaktion haben könnte. Hierfür wurden die Donoren **29** mit 3mer- und **30** mit 11mer-PNA in einer entsprechenden Transferreaktion getestet. Auch hier konnte eine Beschleunigung der Reaktion beobachtet werden, allerdings ohne Einfluss auf die Ausbeute (Abb. 29). Besonders in der Übertragung langer PNA-Sequenzen wird deutlich, dass die Umsetzung zu **DTP** als konkurrierende Nebenreaktion einen beträchtlichen Einfluss auf die Ausbeute an Produkt **P** hat. Da ab einer bestimmten Konzentration an **P** (40% für 11mer-PNA) ausschließlich eine weitere Umsetzung zu **DTP** erfolgt, kann gemutmaßt werden, dass der Donor **28** eine stärkere Bereitschaft zur Reaktion mit **P** als mit dem C-E3-Peptid **36** hat. In Hinblick auf die Reaktivität des Thiols sollte es keinen Unterschied zwischen den beiden geben. Es ist demnach anzunehmen, dass Donor **28** eine höhere Affinität zur Bindung von **DTP** hat. Zum einen ist bekannt, dass Komplexe aus N-terminal acylierten Coiled-Coil-Peptiden über eine höhere Stabilität verfügen, als Coiled-Coil-Paare mit freiem N-Terminus. Dies kann auf die mangelnde Repulsion der positiv geladenen Amine und eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung durch das entsprechende Amid zurückgeführt werden.^[270] Zum anderen ist es denkbar, dass die PNA selbst eine Rolle spielt, indem Wechselwirkungen zwischen der bereits übertragenen Sequenz (in **P**) und dem zu übertragenden Oligomer (im Donor) die Stabilität des reagierenden Komplexes erhöhen. Eine klare Zuordnung welcher Effekt entscheidend ist, kann an dieser Stelle nicht getroffen werden.

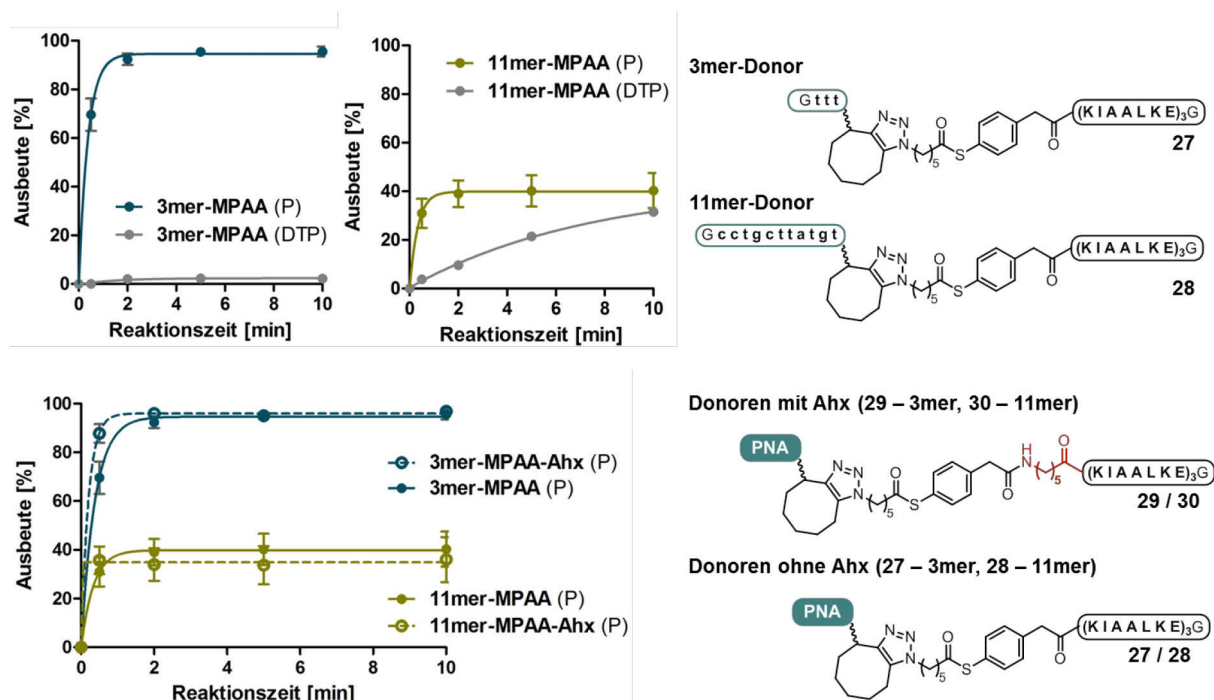


Abb. 29 Zeitabhängige Untersuchungen zur PNA-Übertragung über MPAA-basierte Donor-Konjugate. Bildung der Produkte **P** und **DTP** durch Donor **27** (oben links). Bildung der Produkte **P** und **DTP** durch Donor **28** (oben rechts). Abbildung unten: Vergleich der Produktbildung **P** durch Donor-Konjugate mit (gestrichelte Linie) und ohne (durchgezogene Linie) Ahx-Einheit für den Transfer von 3mer- (blau) und 11mer-Sequenzen (grün).

4.1) PNA-Peptid-Konjugate als selektive PNA-Donoren

Kontrollexperimente

In Kontrollmessungen wurden zum einen die Selektivität des Coiled-Coil-vermittelten Transfers und zum anderen der Einfluss der Hydrolyse als konkurrierende Nebenreaktion betrachtet. Zur Selektivitätskontrolle unter den gewählten Reaktionsbedingungen wurden exemplarisch die Donoren **25** und **28** äquimolar mit dem Kontrollpeptid **38** (siehe Abb. 26) gemischt und im zeitlichen Verlauf Aliquote untersucht. Das Kontrollpeptid verfügt über ein N-terminales Cystein, sollte jedoch keine Interaktion mit dem Donorpeptid selbst eingehen. Repräsentativ sind in Abb. 30A und B die Ergebnisse für den MPA-Donor nach 120 min und für den MPAA-Donor nach 5 min dargestellt. Längere Messzeiten wurden in Anbetracht der Reaktionszeiten für den Coiled-Coil-gesteuerten Transfer nicht als sinnvoll erachtet. In beiden Fällen ist keine unspezifische Umsetzung zu verzeichnen (mittlere Reihe). Auch die Hydrolyse der Thioesterkonjugate ist in diesen zeitlichen Abständen noch nicht zu beobachten (obere Reihe).

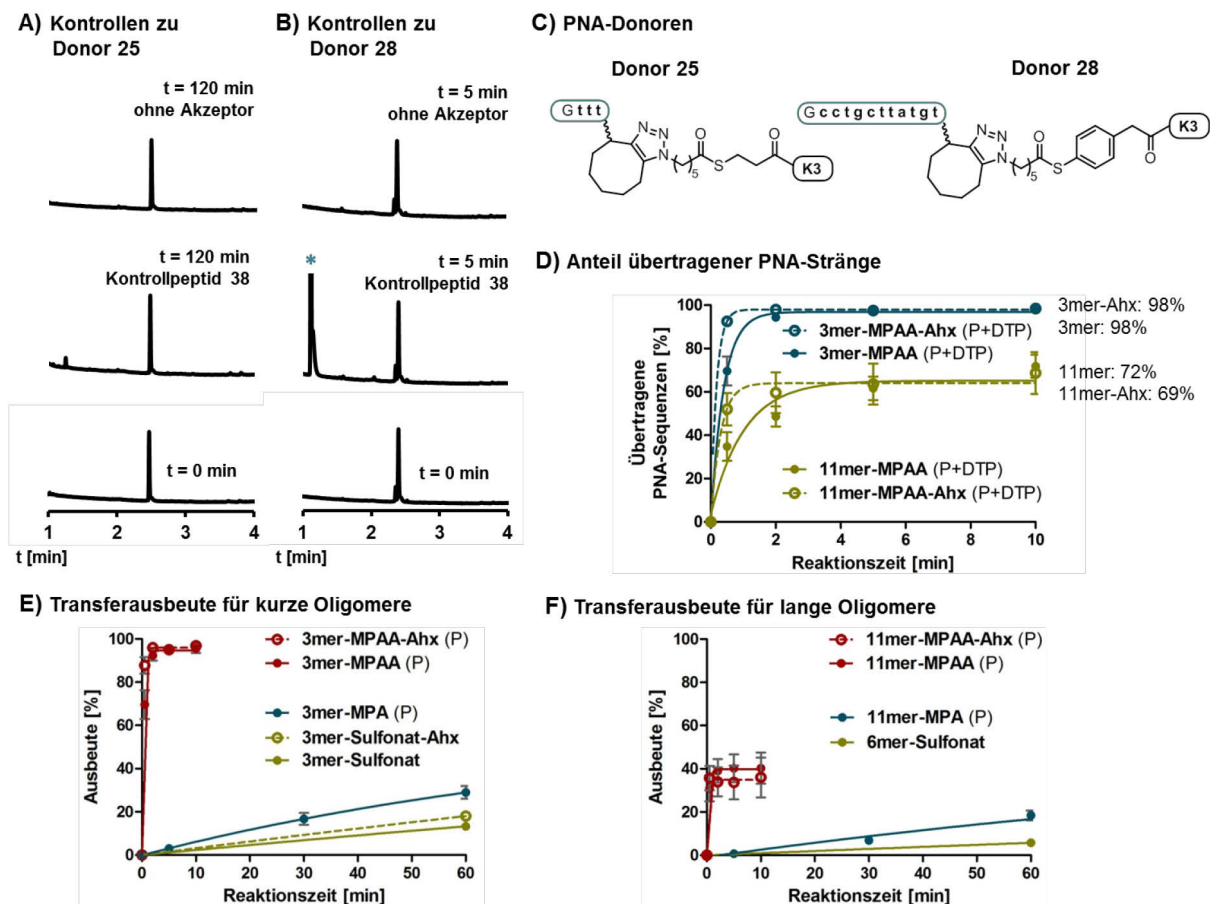


Abb. 30 Chromatogramme bei 260 nm zu den Kontrollmessungen mit A) Donor **25** und B) Donor **28**: 2.5 μ M Donor (unten), 2.5 μ M Donor nach 120 min mit 2.5 μ M Kontrollpeptid **38** (Mitte), 2.5 μ M Donor nach 120 min in Puffer (oben). C) Donoren **25** und **28**. D) Vergleich der Ausbeuten für PNA-tragende E3-Peptide mit einer oder zwei PNA-Sequenzen (Summe aus **P** + **DTP**) in Abhängigkeit von der Zeit. E,F) Vergleich der Produktausbeuten in zeitlicher Abhängigkeit für E) kurze und F) lange PNA-Sequenzen. Stern – Kontrollpeptid.

4.1.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.1)

In diesem Abschnitt wurde eine Syntheseroute zur Herstellung funktionaler PNA-Peptid-Konjugate beschrieben. Sowohl Sulfonate als auch Thioester konnten als reaktive Einheiten eingeführt und in einer templatkontrollierten Reaktion nutzbar gemacht werden. In beiden Fällen wurde das PNA-Oligomer vom K3-Donor- auf das C-E3-Akzeptorpeptid übertragen. Die Konjugation der PNA- und Peptidbausteine erfolgte bevorzugt über die spannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition.

Es wurden drei reaktive Einheiten auf ihre Anwendung in einer PNA-Transferreaktion untersucht: ein Sulfonatbaustein, sowie die Thioester MPA und MPAA. Alle Verbindungen vermittelten einen selektiven Transfer auf das interagierende E3-Peptid. Große Unterschiede ergaben sich in der Kinetik und der Ausbeute der Reaktionen je nach i) Länge der PNA, ii) reaktiver Einheit und iii) der Positionierung der reaktiven Einheit. Diese Transferausbeuten sind in Abb. 30E für kurze und in Abb. 30F für lange PNA-Sequenzen zusammengetragen. Der Sulfonat-vermittelte Transfer ist mit Abstand am langsamsten. Durch die Verwendung von MPA-basierten Donoren konnten in der gleichen Zeit höhere Ausbeuten erzielt werden, dennoch verlief auch hier die Reaktion in einem zeitlichen Rahmen von Stunden. MPAA-basierte Thioester ermöglichten eine drastische Beschleunigung des PNA-Transfers: in 2 min wurde die maximale Ausbeute erreicht. Diese war abhängig von der PNA-Länge und wurde einzig durch das Auftreten von doppeltem Transferprodukt gemindert. Nichtsdestoweniger wurden selbst für lange PNA-Oligomere aus elf Monomeren Ausbeuten von 40% erzielt werden. Für die biologische Anwendung zählt zunächst die Bildung kovalent verbundener PNA-Peptid-Konjugate. Da auch **DTP** eine kovalente Verknüpfung enthält ist eine Betrachtung beider Produkte, **P** und **DTP**, in Summe sinnvoll (Abb. 30D). Für den Transfer von 11mer-Oligomeren bedeutet dies, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen ca. 70% der Akzeptorpeptide mindestens eine PNA-Sequenz tragen.

Eine weitere Beschleunigung der Reaktion wurde beobachtet, wenn durch eine zusätzliche Ahx-Einheit im Donor die Flexibilität erhöht wurde. Es wurde geschlussfolgert, dass MPAA-basierte PNA-Donoren aussichtsreiche Verbindungen für die selektive Markierung von Cysteiny-E3-haltigen Proteinen mit PNA-Oligomeren auch in der zellulären Anwendung sind.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Die im vorhergehenden Kapitel vorgestellten PNA-Peptid-Konjugate auf Basis von MPAA-Thioestern sollten nun auf ihre Anwendbarkeit zur Markierung von Rezeptoren auf Zellen untersucht werden (Abb. 31). Die Zielproteine mussten dafür mit dem Cysteinyl-E3-Peptid ausgestattet werden, was durch Klonierung entsprechender Vektoren und transiente Transfektion möglich ist. Extrazelluläre, membranständige Proteine eignen sich für Initialstudien besonders gut, da das entsprechende Donor-Konjugat nicht in die Zelle hinein gelangen muss, sondern direkt zum Medium gegeben werden kann. Wurde das PNA-Oligomer am Zielprotein installiert, so sollte es im zweiten Schritt durch einen komplementären Strang adressierbar sein. Dieser zweite Schritt kann durch eine fluoreszente Markierung des sekundären Strangs unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Durch diese 2-Schritt-Markierung sollten am Ende nur die Cysteinyl-E3-modifizierten Proteine sichtbar sein und damit i) eine neue, selektive Visualisierungsmethode vorgestellt, sowie ii) der Transfer und die Adressierbarkeit von PNA-Oligomeren in zellulärer Anwendung demonstriert werden.

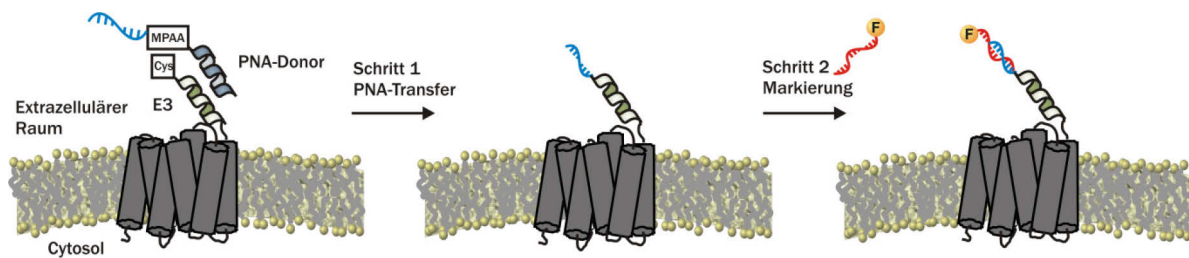


Abb. 31 Schema zur 2-Schritt-Markierung am Beispiel eines GPCRs. Das Protein wird mit dem Cysteinyl-E3-Peptid exprimiert (grün). Schritt 1: Der Donor (blau) überträgt die PNA-Sequenz auf das Protein. Schritt 2: Ein fluoreszent markiertes komplementäres Oligonukleotid (rot) hybridisiert mit dem PNA-Protein-Konjugat. F – Fluorophor.

4.2.1) Selektive PNA-Konjugation an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

4.2.1.1) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

GPCRs stellen die größte Klasse membranständiger Proteine im humanen Genom dar und nehmen vielfältige Rollen in der Signaltransduktion ein.^[271, 272] Die strukturell verbindende Gemeinsamkeit der über 800 Rezeptoren sind die sieben Transmembrandomänen, aus denen diese Rezeptoren bestehen. Außer im Fall des Adiponektinrezeptors befindet sich der N-Terminus im extrazellulären Bereich, während der C-Terminus ins Cytosol ragt. Die ursprüngliche Beobachtung, dass die Signalweiterleitung über die Rekrutierung eines so genannten G-Proteins erfolgt, gilt nicht für alle Mitglieder der Proteinklasse, ist jedoch bis heute namensgebend. Die physiologische Rolle zahlreicher GPCRs ist noch unbekannt (*orphan GPCRs*). Von den bekannten GPCRs hat der Großteil eine Funktion in der olfaktorischen Wahrnehmung,

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

im Geschmacksempfinden oder in der neuronalen Signalweiterleitung.^[271] Die einzelnen Vertreter dieser Proteinklasse werden oftmals nach ihren Liganden benannt. So binden der hY₁- und der hY₂-Rezeptor das humane Neuropeptid Y₁ und humane Neuropeptid Y₂ und genauso bindet der hNPFF1-Rezeptor das humane Neuropeptid FF1. Die genannten Rezeptoren werden unter anderem in der Arbeitsgruppe von Prof. Annette G. Beck-Sickinger (Universität Leipzig, Institut für Biochemie) untersucht. Die in diesem Abschnitt 4.2.1) vorgestellten Resultate wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jonathan Lotze und Dr. Karin Mörl aus diesem Arbeitskreis erzielt. Die Klonierung, Transfektion, Markierung und Mikroskopie wurde dabei von Dr. Jonathan Lotze durchgeführt.^[273]

4.2.1.2) GPCR-Visualisierung über 2-Schritt-Markierung

Markierung über PNA oder PNA·PNA-Duplex

Um den selektiven Transfer einer PNA-Sequenz auf einen Cysteiny-E3-tragenden GPCR zu untersuchen wurden, die Rezeptoren hY₁R und hY₂R in dem Transfektionsvektor pViro2-hygro-mcs so modifiziert, dass sie N-terminal die Sequenz C-(EIAALEK)₃ und eine kurze Glycinkette zur Erhöhung der Flexibilität und des Abstands zum Rezeptor trugen. Die fertigen Konstrukte C-E3-hY₁R und C-E3-hY₂R wurden jeweils zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen genutzt. Um eine direkte Kontrolle des PNA-Transfers im ersten Schritt zu ermöglichen, wurde ein PNA-Donor synthetisiert, der neben der kurzen PNA-Sequenz ttt den Fluorophor 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TMR) überträgt (Abb. 32). Hierfür wurde die PNA-Sequenz an Glycin-beladenem TGR-Harz aufgebaut und mit Fmoc-Lysin mit einer Mmt-Seitenkettenschutzgruppe versehen. Unter mild-sauren Bedingungen wurde die Seitenkette entschützt und TMR

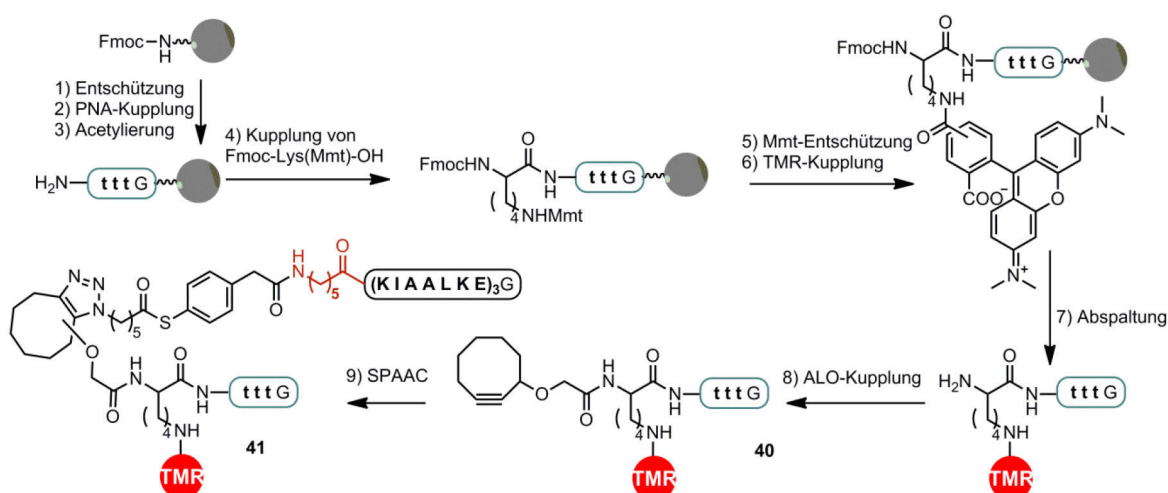


Abb. 32 Synthese des TMR-PNA-Donors **41**. 1) Piperidin : DMF (1 : 4), 2) 4 Äq. Fmoc-PNA-Monomer, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. NMM, 3) Essigsäureanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89), 4) 4 Äq. Fmoc-Lys(Mmt)-OH, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. NMM, 5) 2% TFA, 2% TIS in DCM, 6) 4 Äq. TMR-COOH, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. NMM, 7) H₂O : TIS : TFA (2 : 2 : 96), 8) 20 Äq. ALO, 22 Äq. DIC in DMF, Ausbeute: 12% 9) Peptid **31** : **40** (1 : 1) in ACN : H₂O (1 : 1 mit 1% TFA), Ausbeute: 14%. TMR -5,6-Carboxytetramethylrhodamin.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das TMR-tragende Oligomer vom Harz befreit, mit ALO zum Zwischenprodukt **40** umgesetzt und über SPAAC mit dem azidmodifizierten Thioester-Peptid **31** zum fertigen Donor **41** verknüpft.

Zur Markierung wurden zunächst die Zellkerne mit Hoechst33342 angefärbt und die Zellen anschließend mit 0.1 mM TCEP in HBSS inkubiert, um sicherzustellen, dass N-terminale Cysteine nicht als Disulfide vorliegen. Der PNA-Donor **41** wurde in 200 nM Konzentration für 5 min hinzugegeben, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und die Mikroskopie in Puffer vorgenommen. Wie in Abb. 33A gezeigt, konnte im TMR-Kanal die Fluoreszenz einiger Zellmembranen beobachtet werden. Bei einer transienten Transfektion, wie sie hier vorgenommen wurde, ist nicht von einer hundertprozentigen Transfektionseffizienz auszugehen und somit war es zu erwarten, dass nur einige Zellen den modifizierten Rezeptor exprimieren. Als Kontrolle ist in Abb. 33C der Transfer eines Atto488-Farbstoffs ohne PNA-Oligomer nach bereits etablierter Methode gezeigt.^[82] Hier zeigte sich eine vergleichbare Markierung und Transfektionseffizienz. Damit konnte belegt werden, dass ein PNA-TMR-Konjugat ebenso als Donor fungieren kann, wie ein reiner Fluorophorthioester. In einem weiteren Experiment sollten die transient transfizierten Zellen mit C-E3-hY₁R- und C-E3-hY₂R-Vektor auf die Anwendbarkeit zum Transfer längerer PNA-Sequenzen getestet werden und die anschließende Adressierbarkeit dieser Oligomere untersucht werden. Hierfür wurden die mit Hoechst33342 gefärbten und mit TCEP behandelten Zellen für 5 min mit Donor **30** inkubiert, mit Puffer gewaschen und mit der TMR-markierten PNA-Sequenz **42** behandelt (500 nM, 5 min). Die Zellen wurden mit Puffer gewaschen und die anschließende Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine deutliche membranständige Markierung im TMR-Kanal (Abb. 33B). Die TMR-PNA **42** wurde mit einem zusätzlichen Adenin-Monomer hergestellt, da die direkte Nähe von TMR zur nächsten Nukleobase Guanin zur Verminderung der Fluoreszenz führen kann.^[274, 275] Wie in Abb. 33B gezeigt, werden auch hier nur die transfizierten Zellen markiert, was die Selektivität der Methode belegt. Es soll an dieser Stelle allerdings angemerkt werden, dass wie bei der vorhergehenden Methode des TMR-Transfers auch hier eine leichte Färbung von Zelltrümmern erkennbar war. Dies kann auf die Hydrophobie von PNA-Oligomeren bzw. Farbstoffen zurückgeführt werden, welche insbesondere zur Wechselwirkung mit denaturierten Zellbestandteilen tendieren. In der Summe sind die Ergebnisse überaus zufriedenstellenden und demonstrieren erstmals den selektiven PNA-Transfer auf membranständige Rezeptoren und die Adressierbarkeit der PNA.

Kontrollexperimente

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine selektive 2-Schritt-Markierung der modifizierten Rezeptoren C-E3-hY₁R und C-E3-hY₂R über PNA-PNA-Interaktion möglich ist, sollte über Kontrollexperimente i) die weiterhin bestehende Funktionalität der Rezeptoren, ii) der

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

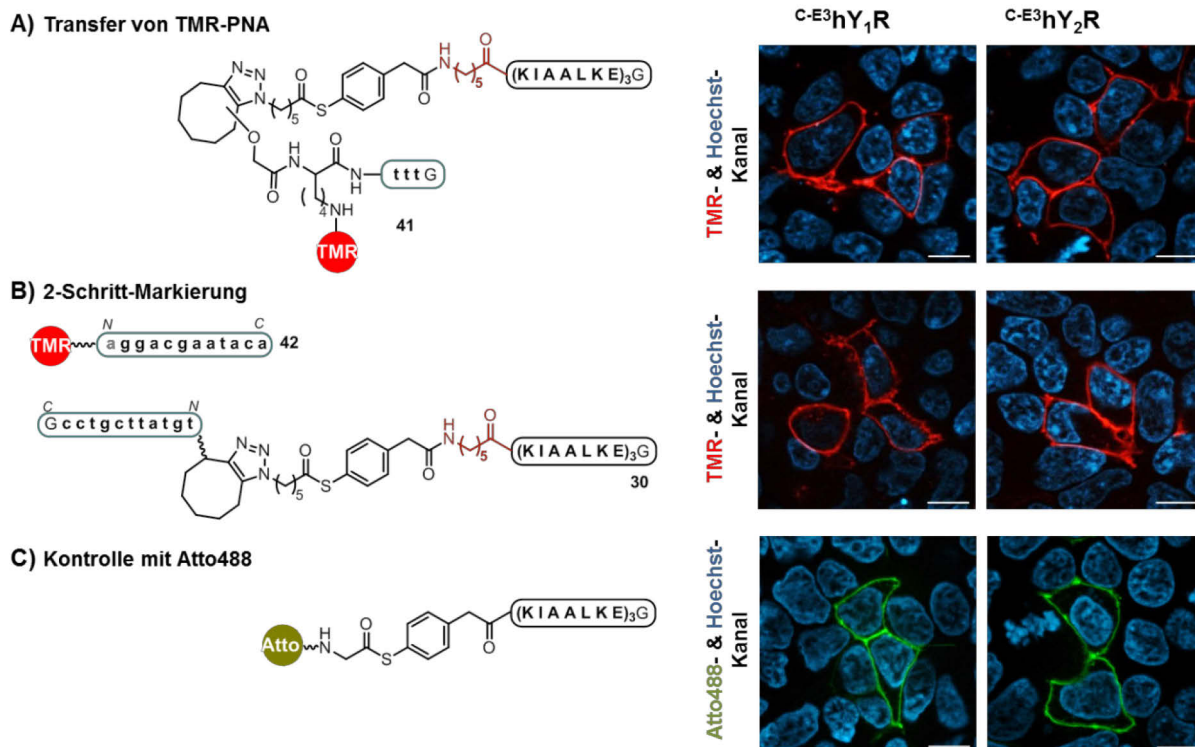


Abb. 33 Markierung der modifizierten GPCRs C-E3-hY₁R und C-E3-hY₂R an der Membran lebender HEK293-Zellen. A) Transfer einer TMR-PNA-Sequenz durch das TMR-PNA-Konjugat **41**. B) 2-Schritt-Markierung, in der zunächst durch den Donor **30** eine 11mer-PNA-Sequenz übertragen und im Folgeschritt TMR-tragendes PNA-Oligomer **42** hinzugegeben wurde. C) Der Farbstoff Atto488 wurde übertragen durch Zugabe des gezeigten Donors in 100 nM Konzentration. Skala = 20 μm

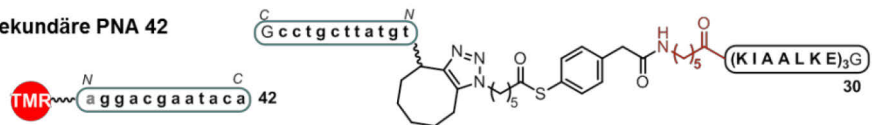
kovalente Charakter der PNA-Anbindung und iii) die Stabilität der Markierung untersucht werden. Funktionalitätsstudien wurden derart vorgenommen, dass die native, also im biologischen Kontext zu erwartende, Reaktion der markierten Rezeptoren auf Stimulation durch ihren Liganden (porkines Neuropeptid Y, pNPY) betrachtet wurde. Das Binden des Liganden führt zur Internalisierung des Rezeptors und kann in der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Die mit C-E3-hY₁R- und C-E3-hY₂R-Vektor transfizierten und analog der Abb. 33B mit Donor **30** und TMR-PNA **42** markierten Zellen wurden für 30 min mit 1 μM pNPY bei 37 °C stimuliert und mikroskopiert (Abb. 34). In beiden Fällen zeigte sich deutlich, dass jene Zellen, die zuvor eine membranständige Markierung mit TMR aufwiesen, nun zum einen eine geschwächte Färbung der Membran zeigten und zum anderen fluoreszente Vesikel im Cytosol trugen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die vorgestellte 2-Schritt-Markierung die Internalisierung der Rezeptoren hY₁R und hY₂R nicht beeinträchtigt und die sekundäre, also im zweiten Schritt eingesetzte, TMR-PNA **42** in das Zellinnere transportiert wird.

Um sicherzustellen, dass der PNA-Strang im ersten Schritt vom Donor auf den Rezeptor übertragen wurde und nicht als nicht-kovalent interagierendes Donor-Konjugat mit weiterhin intakter Thioester-Verbrückung vorliegt, wurden die Zellen im Anschluss an die 2-Schritt-Markierung mit basischem Puffer (200 nM NaHCO₃ in DPBS ohne Ca²⁺ oder Mg²⁺) bei pH 8.6 für

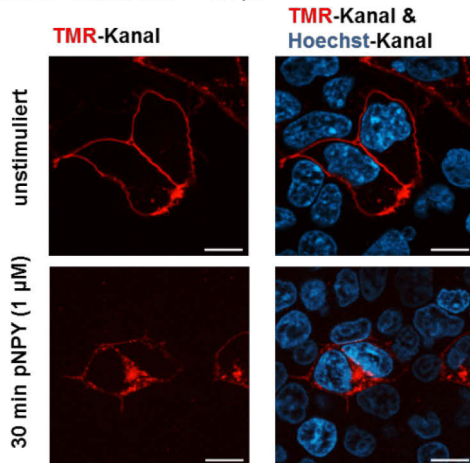
4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

3 min behandelt, mit HBSS-Puffer gewaschen und mikroskopiert. In Vorstudien in vergleichbarem HBSS-Puffer mit einem pH von 6.7 – 7.8 wurde für MPAA-basierte Thioester eine Halbwertszeit von 10 min ermittelt.^[82, 253] Bei einem pH-Wert von 8.6 ist eine deutlich schnellere Hydrolyse des Thioesters zu erwarten, sodass nach 3 min eine Verminderung der Markierung im Fall einer nicht-kovalenten Bindung zu erwarten wäre. Längere Inkubationszeiten mit dem basischen Puffer wurden vermieden, um Zellschädigungen zu verhindern. Beim Vergleich der Effizienz der 2-Schritt-Markierung vor (obere Reihe) und nach der basischen Behandlung (untere Reihe) konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 35A). Dies bestätigt den erfolgreichen PNA-Transfer.

A) Donor **30** (11mer-PNA) und sekundäre PNA **42**



B) HEK-293 –Zellen mit C-E3hY₁R



C) HEK-293 –Zellen mit C-E3hY₂R

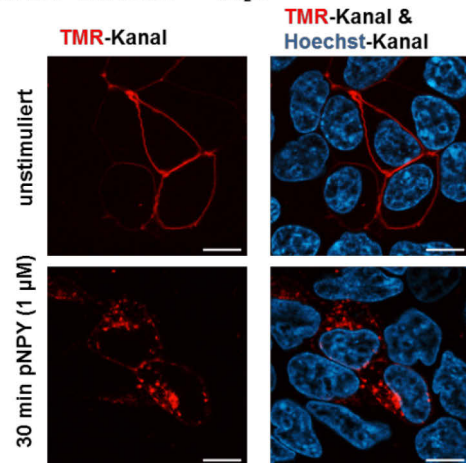


Abb. 34 A) Donor **30** zur Übertragung der 11mer-PNA-Sequenz und sekundäre TMR-PNA **42**. B) Markierung mit Donor **30** und PNA **42** (obere Reihe) und Stimulation (untere Reihe) von HEK293-Zellen mit modifiziertem GPCR hY₁R. C) Markierung mit Donor **30** und PNA **42** (obere Reihe) und Stimulation (untere Reihe) von HEK293-Zellen mit modifiziertem GPCR hY₂R. Skala = 20 μm

Um zu zeigen, dass das 2-Schritt-Vorgehen eine robuste Methode darstellt, wurden die markierten Zellen mit saurem Puffer behandelt. Dies verdeutlicht die Stabilität der Markierung auch in der eventuellen weiteren intrazellulären Prozessierung, die zum Teil unter sauren Bedingungen ablaufen kann. Transportvesikel wie Endosomen, mit einem pH-Wert von 6.1 – 6.8 für frühe und 4.8 – 6.0 für späte Endosomen, oder die für den Abbau wichtigen Lysosomen mit einem pH-Wert bis zu 4.5, sind hierfür klassische Beispiele.^[276] Die 2-Schritt-markierten C-E3-hY₂R-Zellen wurden zweimal für je 1 min mit Glycin-Puffer (50 mM Glycin, 180 mM NaCl) bei einem pH-Wert von 3.1 gehalten. Sie wurden mit HBSS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie Abb. 35B belegt war die Markierung weiterhin zu beobachten, was die besondere Stabilität von PNA-PNA-Doppelsträngen demonstriert.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

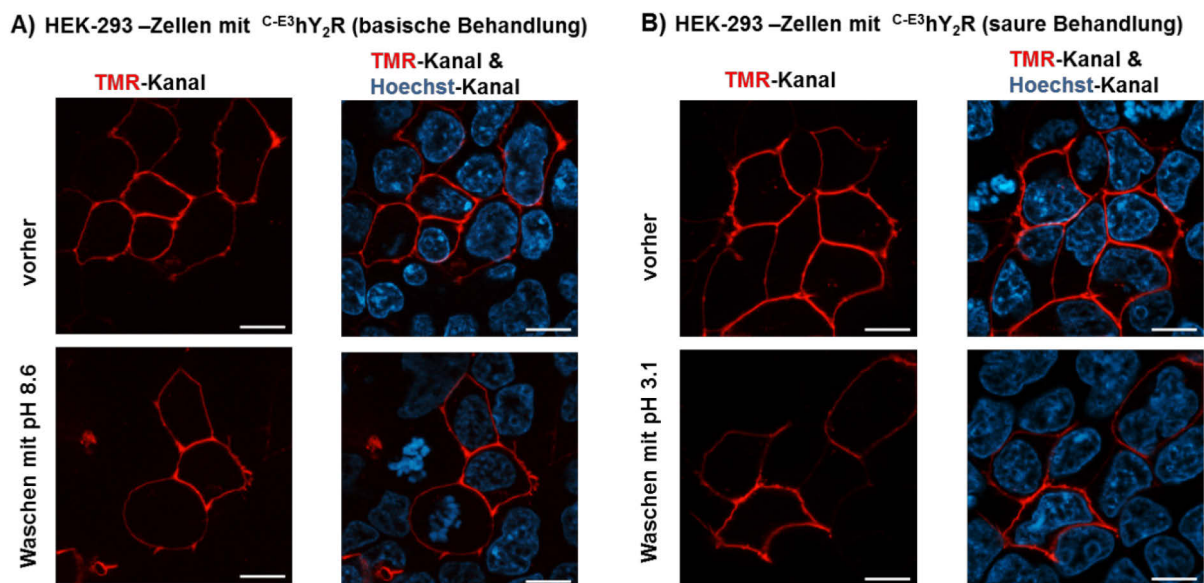


Abb. 35 Kontrollmessungen mit Donor **30** und TMR-PNA **42**. A) Basische Behandlung 2-Schritt-markierter C-E3-hY₂R-transfizierter Zellen mit modifiziertem DPBS-Puffer pH 8.6. B) Saure Behandlung 2-Schritt-markierter C-E3-hY₂R-transfizierter Zellen mit Glycin-Puffer pH 3.1. Die Mikroskopie wurde jeweils vor (obere Reihe) und nach der Behandlung (untere Reihe) durchgeführt. Skala = 20 µm

2-Schritt-Markierung über PNA-DNA-Interaktion

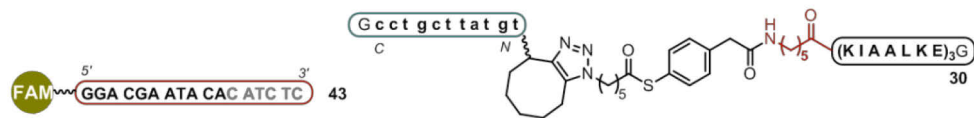
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine selektive und stabile 2-Schritt-Markierung durch den Transfer einer 11mer-PNA und anschließende Hybridisierung mit fluoreszenter PNA möglich ist, wurde die Anwendbarkeit von DNA-Oligonukleotiden für den zweiten Schritt untersucht. Der Wechsel von PNA- zu DNA-Oligomeren sollte zwei Vorteile mit sich bringen: i) DNA-Stränge sind mit einer großen Auswahl an Fluorophoren vergleichsweise günstig kommerziell erhältlich; ii) PNA-Oligomere sind hydrophober und bergen mit zunehmender Länge das Risiko unspezifische Interaktionen einzugehen.

Ein erster Versuch den bisherigen PNA-Donor **30** (Abb. 34) zu verwenden, um eine komplementäre DNA-Sequenz mit dem Farbstoff Atto488 an die Membran zu rekrutieren, verlief erfolglos. Es zeichnete sich eine schwache Markierung ab, wenn der PNA-Donor vorab mit der DNA-Sonde inkubiert wurde und anschließend auf die Zellen gegeben wurde. Es wurde vermutet, dass die PNA-DNA-Interaktion, welche schwächer ist als die analoge PNA-PNA-Interaktion, nicht stark genug war, um zu einer Markierung zu führen. Die gemessene Schmelztemperatur betrug für dieses PNA-DNA-Paar 46 °C (siehe Abb. 22, Kapitel 4.1.2.2). Um diese These zu überprüfen wurden zunächst Experimente unter erniedrigten Temperaturen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits auf eine stabil transfizierte Zelllinie zurückgegriffen werden, welche in konstanten Raten den mit dem Cysteiny-E3-versehenen GPCR hY₂R exprimiert. Hierbei wurde durch Dr. Jonathan Lotze die Modifikation C-E3-hY₂R

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

stabil in das Genom von HEK293-Zellen eingebaut, sodass alle vorhandenen Zellen diese Variation für den modifizierten Rezeptor trugen und für den PNA-Transfer zugänglich sein sollten. Wurde wie bisher die 11mer-PNA-Sequenz durch den Donor **30** übertragen und mit einer komplementären 5,6-Carboxyfluorescein(FAM)-markierten DNA **43** in einer Konzentration von 1 μM auf Eis inkubiert, so konnte eine membranständige Markierung im FAM-Kanal beobachtet werden (Abb. 36B). Selbst 15 min später war die Markierung noch sichtbar, wenn die Zellen auf Eis gehalten wurden. Wurden sie jedoch wieder bei 37 °C gehalten, so reichten bereits 5 min, um die Lokalisierung der Membranen im FAM-Kanal aufzuheben. Diese Beobachtungen stimmen mit der These überein, dass die Stabilität der gebildeten PNA·DNA-Duplexe nicht ausreichte, um bei 37 °C eine stabile Markierung zu gewährleisten.

A) Donor 30 (11mer-PNA) und sekundäre FAM-markierte DNA 43



B) 2-Schritt-Markierung von HEK-293 ($\Delta^{\text{C-E3hY}_2\text{R}}$) über PNA-DNA-Interaktion

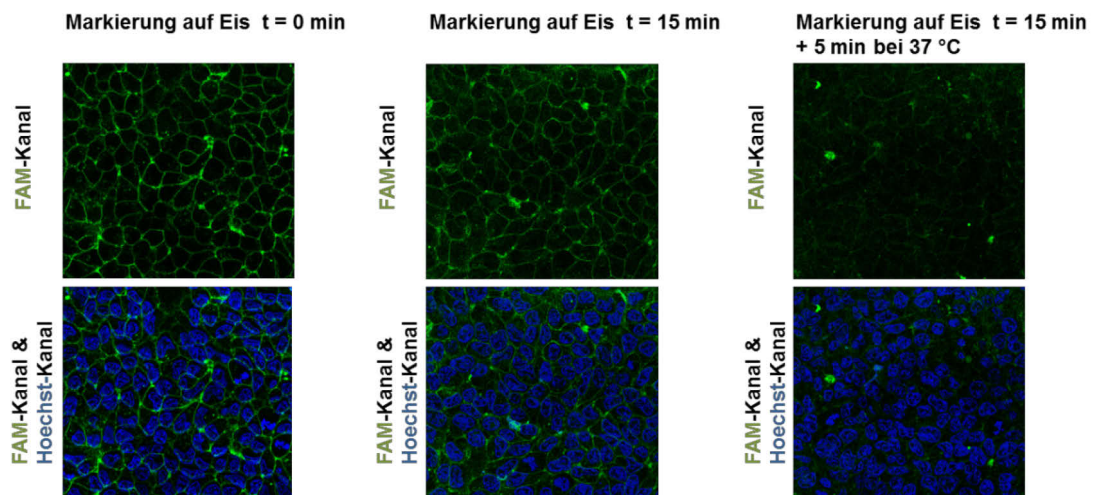


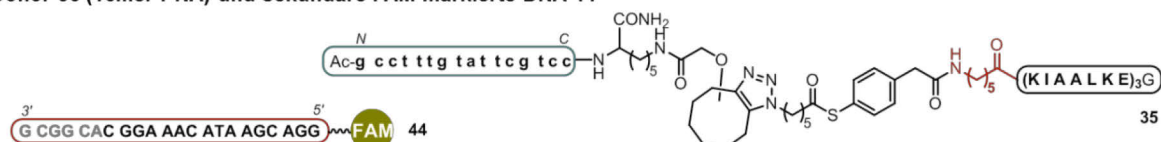
Abb. 36 Markierung durch FAM-DNA. A) Verwendeter Donor **30** und FAM-DNA **43**. B) Markierung der stabil transfizierten HEK293($\Delta^{\text{C-E3hY}_2\text{R}}$)-Zellen: Nach dem PNA-Transfer wurden die Zellen auf Eis gehalten, mit 1 μM FAM-DNA **43** inkubiert, mit eiskaltem Puffer gewaschen und mikroskopiert. Nach 15 min auf Eis wurden die Zellen erneut mikroskopiert. Nach weiteren 5 min bei 37 °C wurde wiederum mikroskopiert.

Um Arbeiten unter annähernd physiologischen Bedingungen, also auch bei Temperaturen von 37 °C, zu ermöglichen, wurde ein Donor-Konjugat hergestellt, welches statt einer 11mer- eine 16mer-PNA-Sequenz überträgt. Im Denaturierungsexperiment ergab sich eine Schmelztemperatur von ca. 66 °C für den PNA·DNA-Duplex, was als ausreichend angenommen wurde. Analog dem bisherigen Vorgehen wurden die stabil transfizierten HEK293($\Delta^{\text{C-E3hY}_2\text{R}}$)-Zellen mit Hoechst33342 angefärbt, mit TCEP reduziert und die 16mer-PNA-Sequenz durch den Donor **35**

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

übertragen. Hierbei wurde erstmalig die PNA-Sequenz in einer Weise übertragen, dass im Produkt der C-Terminus der PNA mit dem N-Terminus des Proteins verknüpft ist. Die Zellen wurden 5 min mit 1 μ M komplementärer FAM-markierter DNA **44** inkubiert, gewaschen und mikroskopiert. Wie in Abb. 37B gezeigt, konnte eine erfolgreiche Markierung der Membran durch FAM-DNA beobachtet werden. Im Vergleich zu der Markierung von transient transfizierten Zellen über PNA-PNA-Interaktion mit Auslesen der Fluoreszenz im TMR-Kanal sind die Signale schwächer. Dies kann auf die geringere Helligkeit und Photostabilität von FAM im Vergleich zu TMR zurückgeführt werden. Doch auch biologische Ursachen könnten eine Rolle spielen. So können die Expressionsraten in der transienten Transfektion stark erhöht sein. Ein höherer Anteil an Cysteiny-E3-markierten Rezeptoren verstärkt in der Folge die Markierung. Es könnte auch möglich sein, dass die längeren 16mer-Stränge in niedrigerer Ausbeute übertragen werden als die PNA-11mere. Allerdings konnte durch die mehrfache Inkubation mit dem Donor keine gesteigerte Fluoreszenz erzielt werden, was gegen eine geringere Transferausbeute spricht (Abb. 38A). Denkbar ist auch, dass der negative Ladungscharakter der DNA, der aus den Phosphatgruppen im Rückgrat resultiert, Einfluss auf die Markierungseffizienz nimmt. Zellmembranen weisen ebenfalls eine negative Gesamtladung an der Oberfläche auf, was zu einer Repulsion führen könnte. Dieser Effekt wird jedoch für eher geringfügig relevant befunden, da der Duplex flexibel am Rezeptor angebracht ist und somit nicht in unmittelbarer Nähe der Membran ist.

A) Donor 35 (16mer-PNA) und sekundäre FAM-markierte DNA 44



B) 2-Schritt-Markierung über PNA-PNA- vs. PNA-DNA-Interaktion

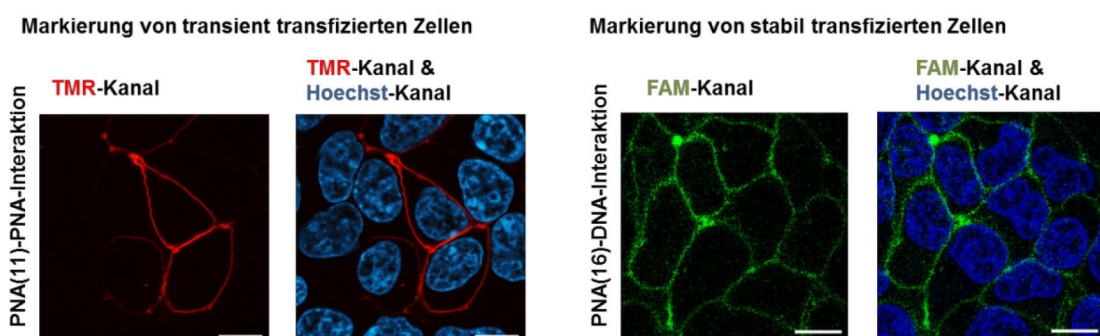


Abb. 37 A) PNA-Donor **35** und anschließend zugegebene FAM-DNA. B) Vergleich der PNA-PNA- und PNA-DNA-basierten Markierung an transient (links) und stabil (rechts) transfizierten Zellen. Links: Durch Donor **30** wurde eine 11mer-PNA auf Rezeptoren auf HEK293-Zellen mit C-E3hY2R-Vektor übertragen und mit TMR-PNA **42** adressiert. Rechts: Durch Donor **35** wurde eine 16mer-PNA auf Rezeptoren auf HEK293(Δ C-E3hY2R)-Zellen übertragen und mit FAM-DNA **44** adressiert. Skala = 20 μ m

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die übertragene PNA durch Hybridisierung mit fluoreszenter DNA adressiert und zur Membranmarkierung genutzt werden kann, sollte die Funktionalität der Rezeptoren nochmals überprüft werden. Hierfür wurden die HEK293(Δ^C -E3hY₂R)-Zellen nach der Markierung erneut mit dem Liganden pNPY für 30 min bei 37 °C stimuliert und anschließend die Internalisierung in der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (Abb. 38B). Es konnte keine Membranmarkierung mehr gefunden werden, was für eine erfolgreiche Internalisierung des Rezeptors spricht. Ohne Stimulation sollte das Signal an der Membran erhalten bleiben. Allerdings waren im FAM-Kanal auch keine Vesikel im Zellinneren zu sehen, wie es zu erwarten wäre und im Fall der Hybridisierung von TMR-PNA **42** beobachtet wurde (vergl. Abb. 34). Zwei Gründe können zur Erklärung angeführt werden: zum einen wurde hier mit der stabil transfizierten Zelllinie mit geringerer Markierungseffizienz gearbeitet. Wird eine von vornherein geringe Menge an markierten Rezeptoren internalisiert und auf Vesikel aufgeteilt, so kommt es zu einer Art „Verdünnung“ der FAM-markierten DNA-Stränge und das Signal kann mit den gleichen Mikroskopeinstellungen, wie etwa Belichtungsdauer und Anregungsintensität, nicht mehr registriert werden. Zum anderen ist DNA im Gegensatz zu PNA anfällig für die Degradation durch Nukleasen. Wird die DNA, wenn auch nur zum Teil, abgebaut, so löst sich der Fluorophor vom hY₂R-Rezeptor, die Markierung verschwindet und es kommt erneut zur „Verdünnung“ des Signals. An dieser Stelle kann nur spekuliert werden und die genaue Aufklärung erfordert weitere Experimente.

Die vorstehend erörterten Resultate zeigen, dass nicht nur die Markierung erfolgreich war, sondern auch die Fähigkeit des Rezeptors auf den Liganden anzusprechen erhalten blieb. Der PNA-tag konnte zur Markierung der modifizierten Rezeptoren hY₁R und hY₂R genutzt werden und die Stimulation mit pNPY führte zu deren Internalisierung.

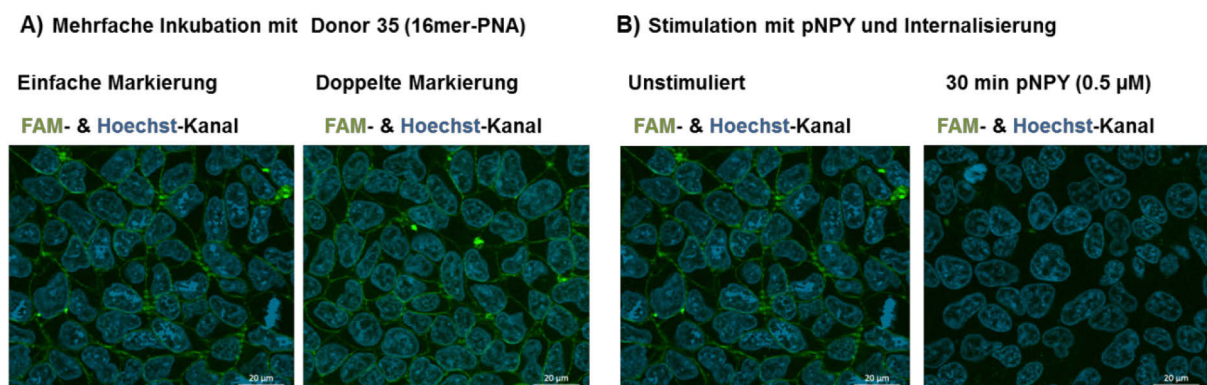


Abb. 38 Markierung von HEK293(Δ^C -E3hY₂R)-Zellen mit Donor **35** und FAM-DNA **44**. A) Vergleich der Markierungseffizienz, wenn der Transfer einfach (links) oder doppelt (rechts) mit je 200 nM Donor für je 5 min durchgeführt wird. B) Effekt der Stimulation von markierten Zellen mit dem Liganden pNPY für 30 min bei 37 °C. Skala = 20 μ m

4.2.2) Selektive PNA-Konjugation an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor

4.2.2.1) Wahl des EGFR und Vektordesign

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Beck-Sickinger die 2-Schritt-Markierung an GPCRs entwickelt wurde, sollte diese Methode nun an einer anderen Proteinklasse weiterentwickelt werden. Der eingangs vorgestellte EGFR stellt hierbei ein interessantes Zielmolekül dar (Kapitel 2.3 und 4.3.1). Der N-Terminus liegt extrazellulär und kann somit durch Insertion des Cysteiny-E3-Peptids für den Coiled-Coil-vermittelten Transfer nutzbar gemacht werden. Der EGFR wurde bereits in zahlreichen Studien sowohl N- als auch C-terminal mit Fusionsproteinen versehen, ohne die ursprüngliche Funktion zu verlieren.^[137, 277-280] Das trifft auch auf die Klonierung einer Coiled-Coil-tragenden E3-EGFR-Mutante zu.^[76, 121] Eine neuartige Markierungsmethode, wie sie hier vorgestellt wird, könnte hilfreich sein, um die genauen Aktivierungsmechanismen des EGFR zu erforschen.

Um eine 2-Schritt-Markierung am EGFR zu ermöglichen, wurde ein Konstrukt C-E3-EGFR-eGFP (eGFP - *enhanced green fluorescent protein*) generiert. Als Ausgangspunkt wurde ein EGFR-eGFP-Vektor verwendet, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Donna Arndt-Jovin (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde. Die Verwendung eines Fusionsproteins mit eGFP am C-Terminus sollte die Transfektionskontrolle vereinfachen, da die Expression des EGFR in der Fluoreszenzmikroskopie dadurch verfolgbar wird. Zudem ist dieses Fusionsprotein bekanntermaßen funktional.^[277] Die Klonierung der Peptidsequenz C-(EIAALEK)₃-GG erfolgte zwischen dem 24-Aminosäure-langen Signalpeptid MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRA und dem N-Terminus des EGFR, wie er an der Zellmembran besteht (siehe Kapitel 6.1.3 und 7.3.1). Das Schneiden durch die Signalpeptidase erzeugt das N-terminale Cystein.

4.2.2.2) Fluoreszenzmikroskopie am PNA-konjugierten EGFR

Der Vektor C-E3-EGFR-eGFP wurde zunächst zur Optimierung der Transfektionsbedingungen genutzt, indem in einer 6-well- oder 24-well-Kulturplatte HEK293-Zellen unter verschiedenen Bedingungen ausgesät, transient transfiziert und in der Fluoreszenzmikroskopie die Expression des fluoreszenten Proteins verfolgt wurde. Die Wahl der Zelllinie fiel auf HEK293-Zellen, da sie zum einen den EGFR natürlich exprimieren und somit über die Proteinmaschinerie verfügen, die eine korrekte Expression und Lokalisation, wie auch weitere Signaltransduktion bei Aktivierung ermöglichen. Zum anderen sind die natürlichen Expressionsraten an EGFR auf HEK293-Zellen mit ca. 10.000 Rezeptoren nicht besonders hoch.^[281] Damit liegt der Großteil des exprimierten EGFRs als Fusionsprotein vor, was vor allem in späteren Dimerisierungsexperimenten relevant ist (Kapitel 4.3). Erste Mikroskopieexperimente, in denen das allgemeine Protokoll etabliert

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

wurde, wurden am Axio Observer A.1 von Zeiss mit 20-fach vergrößerndem Objektiv durchgeführt. Das Vorgehen (Kapitel 6.3.11) und die Ergebnisse (Kapitel 7.3.2.1) sollen hier nicht im Detail geschildert werden, sondern nur kurz die Resultate wiedergegeben werden:

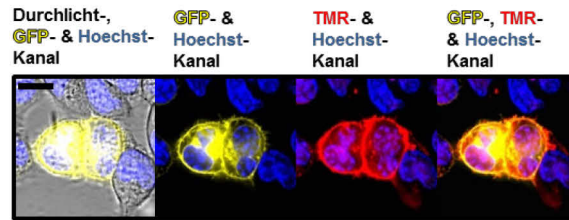
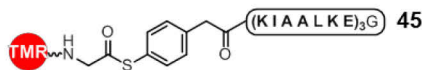
- TMR-K3-Peptide mit und ohne Thioester zwischen Peptid und Fluorophor markierten allein Zellen mit dem modifizierten C-E3-EGFR-eGFP, nicht jedoch jene mit EGFR-eGFP
- die 2-Schritt-Markierung mit Donor **30** und TMR-PNA **42** konnte am C-E3-EGFR-eGFP etabliert werden
- in Abwesenheit von Donor **30** erfolgte keine Markierung durch TMR-PNA **42**, allerdings konnte zum Teil unspezifische Adhäsion beobachtet werden
- die 11mer-PNA-Sequenz, die durch Donor **30** übertragen wurde, konnte durch komplementäre DNA mit Cy3- und Cy5-Markierung adressiert werden.

Um diese ersten Resultate zu validieren und tiefergehende Untersuchungen zu ermöglichen, wurden weitere Experimente über Fluoreszenzmikroskopie mit höherer Auflösung bei 60-fach vergrößerndem Objektiv am Inversmikroskop IX83 von *Olympus* durchgeführt. Die Aufnahmen wurden jeweils als Z-Stapel mit 0.27 μm Abstand aufgenommen und ein Satz an Stapeln über die Anwendung der Wiener-Dekonvolutionsmethode zu einem hintergrundkorrigierten Bild verrechnet. Es wurden 8-well-Zellkulturplatten mit Polymerboden verwendet und die Zellzahlen sowie die Transfektionsbedingungen optimiert. Die besten Resultate wurden bei Beschichtung der Platten mit 0.01%-iger Poly-D-Lysin-Lösung und 10,000 Zellen je Abschnitt erzielt. Vor jeder Markierung wurden die Zellen mit dem Zellkernfarbstoff Hoechst33342 angefärbt und für 2 min mit 0.1 mM TCEP in PBS behandelt, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Zellkerne sind in den folgenden Abbildungen in blau ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \pm 50 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50 \text{ nm}$) zu erkennen und zeigen das Vorhandensein intakter Zellen an. Das Signal des eGFP ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$) wurde unter Filtereinstellungen aufgenommen, die für das Markerprotein YFP ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \pm 24 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 520 \text{ nm}$) ausgelegt sind, da kein GFP-Kanal verfügbar war. Die spektrale Überlappung ist aber ausreichend, um ein aussagekräftiges Bild zu erzeugen. Die Belichtungszeiten wurden durch alle Experimente hindurch gleich gehalten. In der erhöhten Auflösung konnte sichtbar gemacht werden, dass der EGFR wie erwartet vorwiegend auf der Zellmembran zu finden ist.

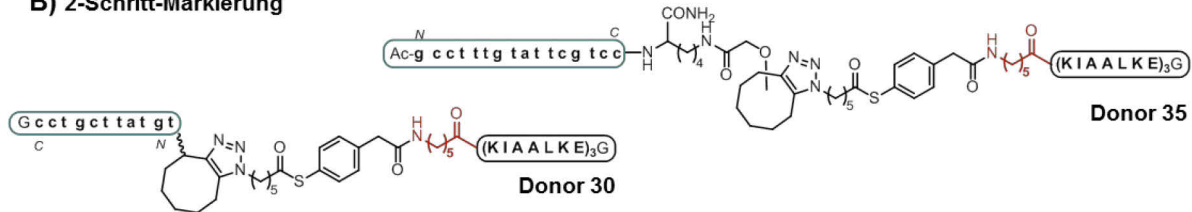
In einem ersten Experiment wurde der Transfer des TMR-Fluorophors durch den Donor **45** wiederholt und die Zellen mit basischem Puffer (200 nM NaHCO_3 in PBS, pH 9.0, 2 min) behandelt (Abb. 39A). Die TMR-Markierung war weiterhin vorhanden und kolokalisiert mit dem eGFP-Signal. Dies belegt den selektiven und kovalenten Transfer des Fluorophors, da im Fall einer nicht-kovalenten Anlagerung des TMR-MPAA-K3-Peptids durch die basische Hydrolyse des Thioesters die Markierung verschwinden würde. Allein Zellen, die den Rezeptor mit C-E3-tag trugen wurden markiert.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

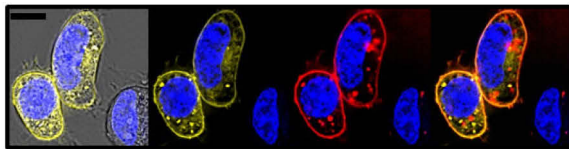
A) Markierung über TMR-MPAA-K3 mit basischem Waschen bei pH 9.0



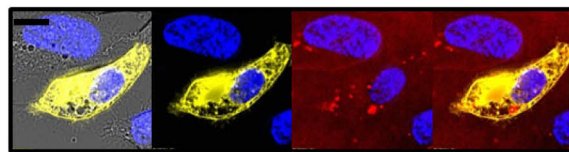
B) 2-Schritt-Markierung



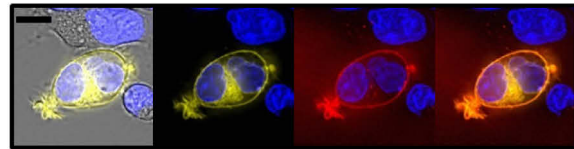
Donor 30 & 42



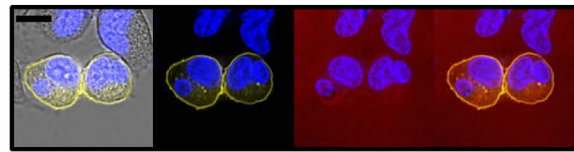
Kein Donor, nur 42



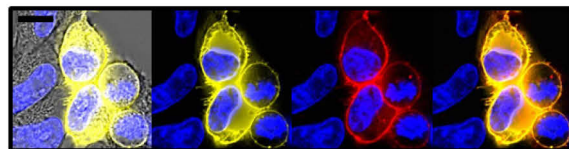
Donor 35 & 47



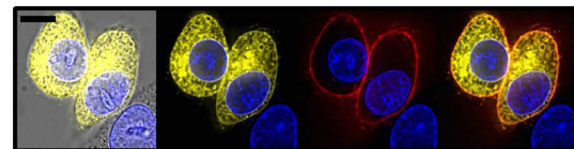
Kein Donor, nur 47



Donor 30 & 46



Donor 35 & 48



C) Fluorophore

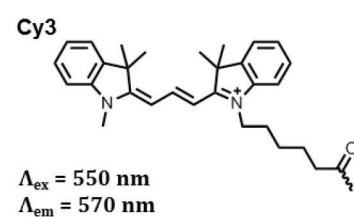
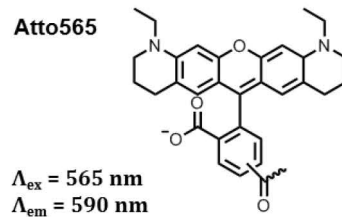
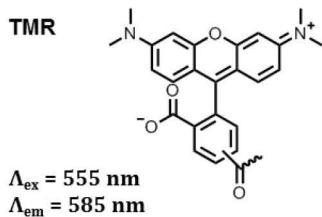


Abb. 39 EGFR-Markierung A) Donor 45 überträgt allein den Fluorophor TMR. Die Aufnahme im Durchlicht mit GFP- und Hoechst-Signalen zeigt welche Zellen transfiziert sind. Die Aufnahme im TMR-Kanal und die Überlagerung mit dem GFP-Signal zeigt die Selektivität der Markierung. B) 2-Schritt-Markierung mit einer 11mer-Sequenz durch Donor 30 (links) und mit einer 16mer-Sequenz durch Donor 35 (rechts). Donor 30 kann durch PNA (oben) und DNA (unten) markiert werden. Es sind nur unspezifische Artefakte zu sehen, wenn TMR-PNA 42 ohne vorhergehenden PNA-Transfer angewendet wird. Donor 35 wurde durch Cy3- (oben) und Atto565- (unten) tragende DNA markiert. Keine Markierung ist zu sehen, wenn Donor 35 nicht angewandt wurde. Die Ausgabeparameter wurden so angepasst, dass ein optimales Bild ohne Informationsverlust erzielt wurde. Skala – 10 μm . C) Strukturen sowie Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Analog zu der Markierung von GPCRs wurde am EGFR die 2-Schritt-Markierung durchgeführt. Je 100 nM Donor **30** oder **35** wurden nach Hoechst-Färbung und TCEP-Behandlung in PBS-Puffer bei pH 7.0 für 4 min auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden gewaschen und mit einer 200-nanomolaren Lösung der komplementären PNA- oder DNA-Sequenz für 5 min behandelt. Dabei wurden verschiedene Fluorophore mit verschiedenen strukturellen Grundgerüsten getestet, um die Austauschbarkeit der Farbstoffe zu demonstrieren (Abb. 39C). Während TMR und Atto565 zu der Kategorie der Rhodamin-basierten Fluorophore gehören, wurde zusätzlich ein Vertreter der Cyanin-Farbstoffe, Cy3, verwendet. Alle können im TRITC-Kanal ($\lambda_{\text{ex}} = 575 \pm 25 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 593 \text{ nm}$) ausgelesen werden, welcher keine Überlappung mit dem Signal des fluoreszenten Proteins aufweist. In der Überlagerung aus Durchlichtbild, GFP- und Hoechst-Signal sind transfizierte Zellen mit Zellkern erkennbar. Nach Transfer des 11mer-PNA-Strangs durch Donor **30** und anschließender Inkubation mit komplementärer TMR-PNA **42** sind allein jene Zellen im TRITC-Kanal markiert, die auch transfiziert sind (Abb. 39B, oben links). Dies trifft auch bei der Markierung mit Cy3-DNA zu **46** (Abb. 39B, unten links). Die 2-Schritt-Markierung des C-E3-EGFR-eGFP über PNA·PNA- bzw. PNA·DNA-Interaktion ist demnach erfolgreich und selektiv. In der Anwendung der TMR-markierten PNA **42** ohne vorhergehenden Transferschritt, ist allerdings zum Teil eine leichte unspezifische Anlagerung der TMR-PNA erkennbar (Abb. 39B, Mitte links). Wiederum ist es mutmaßlich die Hydrophobizität des Moleküls, welche zur Aggregation führt. Die Verknüpfung der hydrophoben PNA mit einem ebenfalls hydrophoben Farbstoff wie TMR erweist sich demnach als Nachteil. Für den Transfer von 16mer-PNA durch Donor **35** wurde folglich von der Anwendung komplementärer PNA abgesehen und zum einen Cy3- (Abb. 39B, oben rechts) und zum anderen Atto565- (unten rechts) tragende DNA verwendet. Eine selektive Markierung transfizierter Zellen war auch hier erfolgreich und der Hintergrund blieb gering (Mitte rechts). Es ist zu betonen, dass die Signalintensität und damit letztlich das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Wahl des Atto-Farbstoffs bemerkenswert verbessert werden konnte. Die Zellmembran zeichnet sich besser vom Hintergrund ab und der Kontrast wird deutlicher (Abb. 39B, unten rechts). Während die Quantenausbeuten für TMR bei 0.28 und für Cy3 bei 0.15 liegen, ist die Quantenausbeute mit 0.92 für Atto565 dem weit überlegen und auch der Extinktionskoeffizient beim Absorptionsmaximum mit 120,000 L/(mol·cm) deutlich höher. Während für die Anwendung von TMR- und Cy3-Markern Durchschnittsintensitäten von 3,000 Zählern ergab, war für die Markierung über Atto565 eine Intensität von 16,000 Zählern zu verzeichnen. Dies demonstriert, wie die PNA-Markierung einfach genutzt werden kann, um die Wahl der Fluorophore und deren spektraler Eigenschaften nach Bedarf zu variieren. Es ist keine neue Synthese von Donormolekülen erforderlich und die fluoreszent markierten DNA-Oligonukleotide für den zweiten Schritt sind mit einer Vielfalt an Farbstoffen kommerziell erhältlich.

4.2.3) Multi-Marker zur verstärkten Markierung am EGFR

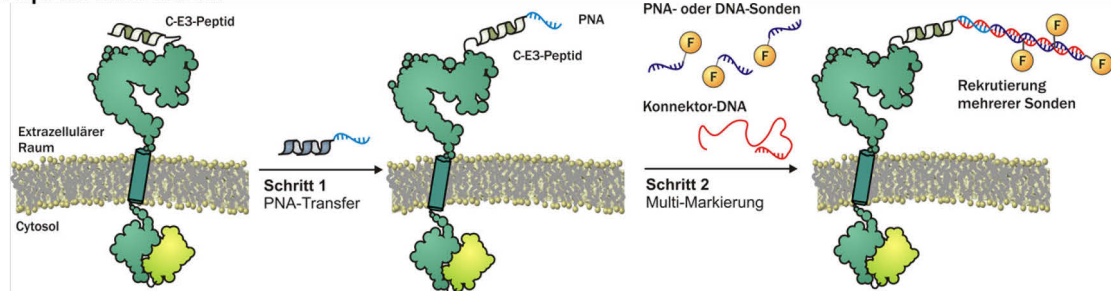
Nicht nur über die Wahl der Fluorophore, auch über deren Anordnung sollte die Helligkeit der Markierung bestimmbar sein. Wie einleitend erwähnt, sind etwa über Origamitechnologie erzeugte DNA-Strukturen hilfreich, um beispielsweise Fluorophore in definierten Abständen zu präsentieren. An dieser Stelle soll der Vorteil des PNA-tags als universelle Einheit zur variablen Nutzung demonstriert werden, indem mehrere Fluorophore parallel an einem einzelnen Zielprotein installiert werden. Das Konzept dieser Multi-Markierung ist in Abb. 40A dargestellt. Die installierte Primär-PNA wird dabei genutzt, um eine Konnektor-DNA zu binden. Diese verfügt über mehrere repetitive Sequenzen, die in der Folge mehrere PNA- oder DNA-Sonden rekrutieren kann. Im gezeigten Beispiel sollten drei Fluorophor-PNA/DNA-Sonden gebunden werden können, was in der Mikroskopie zu einer verdreifachten Intensität der Markierung führen sollte.

Das Konzept der Multi-Marker wurde zunächst anhand von PNA-Sonden geplant und an Sequenzlängen von 16 (**50**) bzw. 20 Monomeren (**53**) getestet (Abb. 40B bzw. 40C). Mindestens 16mere wurden gewählt, da die Messungen für PNA·DNA-Marker für GPCRs (Abb. 37) und den EGFR (Abb. 39B) besonders gute Ergebnisse zeigten. Bei der Wahl der Sequenz wurde auf einen hohen G/C-Anteil geachtet, um eine möglichst hohe Schmelztemperatur zu garantieren. Zudem wurden der Abstand der Fluorophore und die Torsion betrachtet. Bei hoher Proximität von Fluorophoren, kann es zur Auslöschung der Fluoreszenz durch Energietransfer kommen. Ein gängiges Maß zur Beurteilung des Energietransfers ist der Förster-Radius (siehe Kapitel 2.2.2). Befinden sich Fluorophor und Löscher im Abstand des Förster-Radius' zu einander, wird die Fluoreszenz zu 50% gelöscht. Für gewöhnlich sind diese Radien im zweistelligen Ångströmbereich. Der Förster-Radius für die Selbstlöschung von FAM, also die Interaktion zweier Fluoresceinmoleküle, beträgt beispielsweise 44 Å.^[282] Für einen rigiden PNA·DNA-Duplex mit einem Einzelbasenabstand von 3.23 Å ergeben sich Abstände zwischen den TMR-Molekülen von ca. 52 Å für 16mer-Sonden und ca. 65 Å für 20mer-Sonden. Zusätzlich wurde die Torsion durch die PNA·DNA-Helix betrachtet, da eine verdrillte Anordnung der Farbstoffe eine Wechselwirkung unwahrscheinlicher macht. Eine durchschnittliche Drehung von 28° je Nukleobase führt zudem zu einem theoretischen Torsionswinkel von 88° bzw. 160° zwischen den einzelnen Fluorophoren. Dies sind Modellbetrachtungen, die Einflüsse wie etwa die Flexibilität des Fluorophors nicht einbeziehen. Es ist anzunehmen, dass derartige Abstände und Verdrillung eine Fluoreszenzlöschung ausreichend minimieren. Es wurde zudem eine DNA- anstelle einer PNA-Sonde getestet (Abb. 40C). Hier wurde ein geringerer Hintergrund erwartet, da eine Aggregation unwahrscheinlich ist. Allerdings wurde hier allein die 20-Oligonukleotid-lange Variante untersucht, da die errechnete Schmelztemperatur für das 16mer bei $T_M^{16\text{DNA}\cdot\text{DNA}} = 57\text{ °C}$ und für das 20mer bei $T_M^{20\text{DNA}\cdot\text{DNA}} = 64\text{ °C}$ lang.

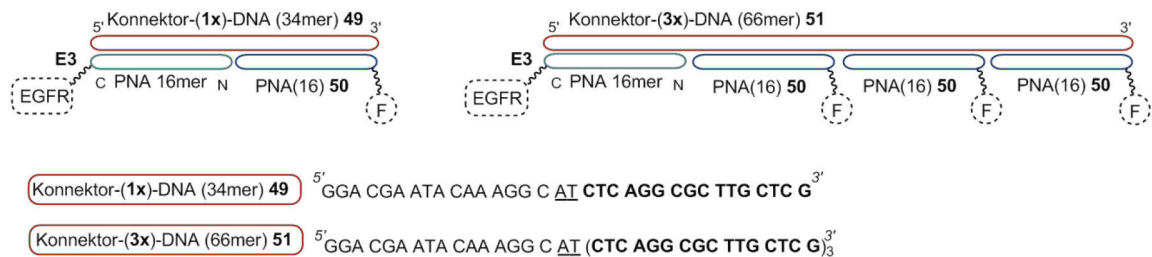
4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Die so gewählten PNA-Sonden **50** und **53** trugen über eine Diethylenglykol-Einheit verbunden den Fluorophor TMR (Abb. 40C). Die DNA-Sonde **55** wurde ebenfalls zur Vergleichbarkeit am 5'-Ende mit TMR ausgestattet. Die Konnektor-DNA-Stränge wurden so gewählt, dass sie jeweils eine (Konnektor **49** und **52**) oder drei (Konnektor **51** und **54**) Sonden binden konnten. Damit sollte ein direkter Vergleich der Intensitäten ermöglicht werden. Zudem wurde zwischen der PNA-tag-bindenden Einheit und der Sonden-bindenden Einheit zwei Platzhalter-Nukleotide „AT“ eingefügt, um eine gewisse Flexibilität zu erlauben und damit potenziellen Problemen in der räumlichen Ausrichtung vorzubeugen. Die Ausbildung der PNA-DNA-Doppelstränge wurde über native Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe Kapitel 7.3.3).

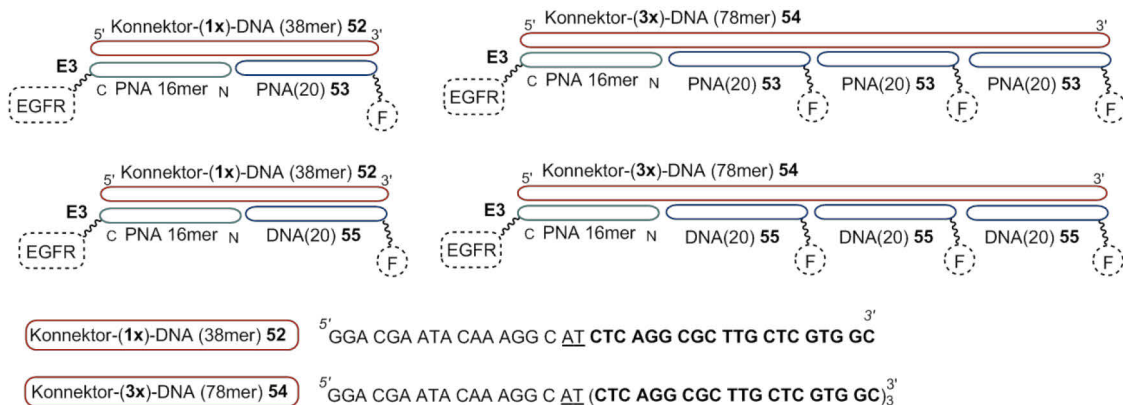
A) Konzept der Multi-Marker



B) Sequenzen zur Multi-Markierung mit 16mer-PNA-Sonden



C) Sequenzen zur Multi-Markierung mit 20mer-PNA/DNA-Sonden



D) Sonden

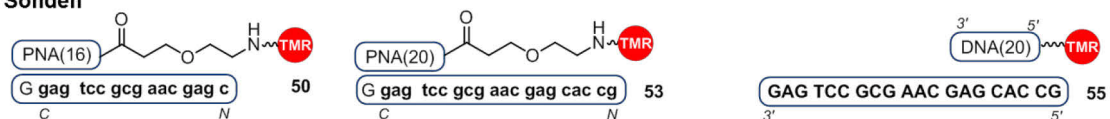
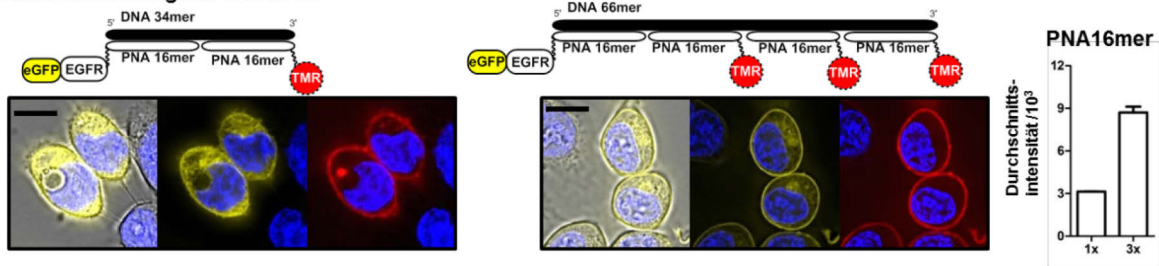


Abb. 40 A) Konzept der Multi-Markierung. B) Verwendete Sequenzen zur Multi-Markierung mit 16mer-PNA-Sonden: Konnektor-DNA-Stränge **49** und **51**, binden jeweils eine oder drei PNA-Oligomere **50**. C) Verwendete Sequenzen zur Multi-Markierung mit 20mer-PNA/DNA-Sonden: Konnektor DNA-Stränge **52** und **54**, binden wahlweise jeweils ein oder drei PNA-Oligomere **53** oder DNA-Oligonukleotide **55**.

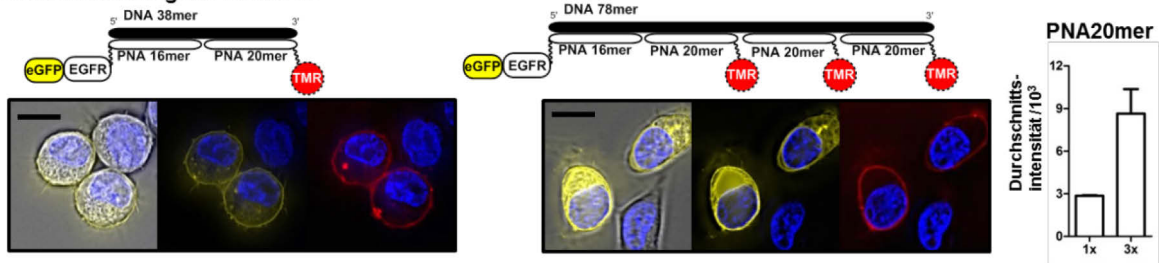
4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Zur Multi-Markierung wurden erneut HEK293-Zellen ausgesät und transient mit dem C-E3-EGFR-eGFP-Vektor transfiziert. Nach Anwachsen über Nacht wurden die Zellen mit dem Hoechst-farbstoff angefärbt, mit 0.1 mM TCEP behandelt und die 16mer-PNA-Sequenz über Donor 35 (Abb. 39) installiert. Die Multi-Markierung wurde durchgeführt, indem die fertigen Konnektor-Sonden-Komplexe hinzugegeben wurden. Hierfür wurden die einzelnen Stränge zuvor hybridisiert, indem sie in 1 μ M Konzentration auf 90 °C erhitzt und mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min auf 10 °C abgekühlt wurden. Für die einfache Markierung wurde 1 μ M Konnektor-DNA mit 1 μ M PNA-Sonde hybridisiert, während für die dreifache Markierung zu 1 μ M Konnektor-DNA 3 μ M PNA-Sonde in Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) gegeben wurde. Diese Komplexe wurden in PBS-Puffer zu einer Konzentration von 200 nM verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur auf die PNA-tragenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 41). Eine selektive

A) Multi-Markierung mit Sonde 50



B) Multi-Markierung mit Sonde 53



C) Multi-Markierung mit Sonde 55

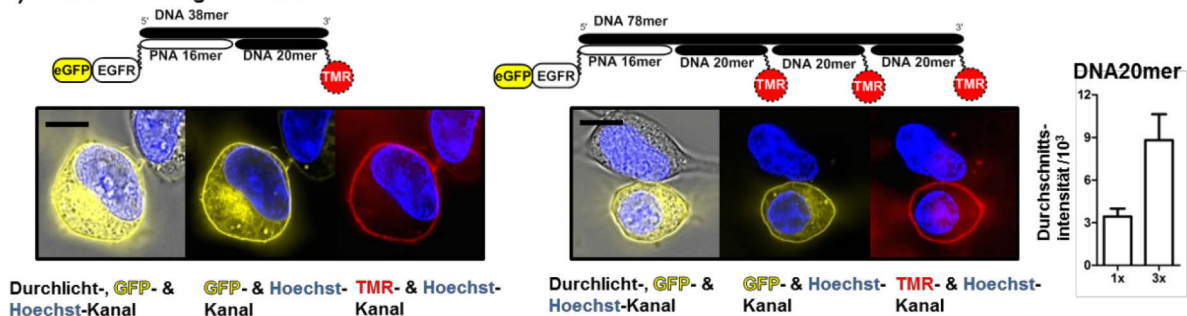


Abb. 41 Multi-Markierung mit verschiedenen Sonden: einfache (links) und dreifache (Mitte) Markierung mit TMR und die ermittelten Durchschnittsintensitäten (rechts). A) PNA(16)-Sonde 50 mit Konnektor 49 oder 51. B) PNA(20)-Sonde 53 mit Konnektor 52 oder 54. C) DNA(20)-Sonde 55 mit Konnektor 52 oder 54. Ausleseparameter wurden derart angepasst, dass die Markierung jeweils gut erkennbar ist (keine direkte Vergleichbarkeit unter einander). Skala – 10 μ m.

4.2) PNA-Transfer auf zelluläre Rezeptoren zur selektiven Markierung

Markierung des C-E3-EGFR-eGFP war durch alle Komplexe möglich, allerdings waren deutliche Unterschiede in der Qualität zu verzeichnen. Die Durchschnittsintensität des Signals, welches im TMR-Kanal aufgenommen wurde, wurde über mehrere Aufnahmen gemittelt und im Balkendiagramm in Abb. 41 dargestellt. Dabei wurde die Intensität der Rohdaten vor der Anwendung der Wiener-Dekonvolutionsmethode genutzt. Komplexe, die dreifach mit TMR ausgestattet waren, zeigten eine dreifach erhöhte Intensität gegenüber der Verwendung einer TMR-Sonde. Da das Signal der einfach gebundenen TMR-Sonde wie zuvor jeweils bei ca. 3,000 Zählern liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Sonden jeweils vollständig gebunden wurden. Das hier gezeigte Multi-Markersystem stellt demnach eine Methode dar, die eine quantitative, kontrollierte Organisation von Molekülen an Rezeptoren erlaubt. Es soll hervor-gehoben werden, dass die Möglichkeit parallel mehrere Moleküle anzubringen nicht auf Fluorophore begrenzt sein muss. Auch könnten, je nach Gestaltung der DNA-Sequenz, verschiedene Reportergruppen oder Effektoren zugleich an einem Rezeptor gebunden werden.

4.2.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.2)

In diesem Kapitel konnte die erfolgreiche Anwendung der MPAA-basierten Donoren **30** und **35** zur Installation einer PNA-Sequenz an Cysteiny-E3-modifizierten Rezeptoren auf der Membran lebender Zellen gezeigt werden. Nicht nur konnte die PNA kovalent angebracht werden, sondern auch durch fluoreszente, komplementäre PNA oder DNA selektiv adressiert werden. Dabei wurde der Transfer in kürzester Zeit von 2 – 5 min und geringen Donor-Konzentrationen von 100 – 200 nM realisiert. Dies konnte an drei Rezeptoren, hY₁R, hY₂R und EGFR aus zwei sehr unterschiedlichen Rezeptorfamilien, GPCRs und RTKs, demonstriert werden. Die Austauschbarkeit der fluoreszenten Reportergruppen wurde durch die Anwendung von TMR, Cy3 und Atto565 belegt. Ergänzend wurde durch die Multi-Markierung ein Konzept zur Steigerung der Intensität vorgestellt, durch welche Rezeptoren sensitiver detektiert werden können. Im Verlauf der Experimente wurden allerdings folgende Aspekte deutlich: i) die Duplexstabilität muss auch bei 37 °C gegeben sein und somit sollte auf eine ausreichende Schmelztemperatur geachtet werden. Dies kann durch einen hohen G/C-Anteil und eine entsprechende Oligomer-Länge erreicht werden. ii) PNA und PNA-TMR-Konjugate können durch ihre hydrophobe Natur zu einem erhöhten Hintergrund führen.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR nach PNA-Transfer

4.3.1) EGFR-Dimerisierung und -Aktivierung

Einleitend wurde die Rolle des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) für grundlegende zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Differenzierung, bereits umrissen. Die Deregulierung, wie etwa eine vermehrte Expression oder Mutation dieses Rezeptors, steht in Verbindung mit diversen Tumorarten, beispielsweise Lungen- oder Brustkrebs und der Ausbildung von Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen.^[1] Eine prominente Mutante, die in mehreren Krebsarten anzufinden ist, ist EGFRvIII. Hier fehlt ein beträchtlicher Teil der extrazellulären, ligandbindenden Domänen, was erstaunlicherweise die Interaktion mit Wildtyp-EGFR nicht behindert, sondern im Gegenteil zu einer permanenten Aktivierung und im Resultat einem gesteigerten Tumorwachstum führt.^[1, 283] Yarden und Schlessinger waren die ersten, die 1987 die Dimerisierung des EGFR als einen grundlegenden Teilschritt der Aktivierung dieses Rezeptors beschrieben.^[132] Seither, bestärkt durch das Wissen um den therapeutischen Nutzen, wird die Di- und Oligomerisierung im Zusammenhang mit der kanonischen und kanzerogenen Aktivierung des EGFR untersucht.

4.3.1.1) EGFR-Aktivierung im zellulären Kontext

Der EGFR besteht aus den vier extrazellulären Domänen I - IV, einer helikalen Transmembrandomäne (TM), der Juxtamembranregion (JM), der Kinase und einer C-terminalen tyrosinhaltigen Aktivierungsdomäne (Abb. 42). Die Bindung von verschiedenen möglichen Liganden wie EGF, TGF α , HB-EGF, Epiregulin oder Betacellulin erfolgt zwischen den Domänen I und III am extrazellulären Teil.^[1, 5] Zwei EGF-Rezeptoren sind bei Aktivierung über die Domäne II, auch Dimerisierungsarm genannt, miteinander verbunden. Der EGFR kann zudem auch mit einem anderen verwandten Rezeptor aus der ErbB-Familie dimerisieren. Ist die Dimerisierung mit Ligandbindung erfolgt, findet die Autophosphorylierung *in trans* statt. Das heißt, dass ein asymmetrisches Dimer gebildet wird, in welchem die intrazelluläre Kinase-Domäne des einen Rezeptors den C-terminalen Teil des anderen phosphoryliert. Zwanzig verschiedene Tyrosinreste, z.B. Y845, Y992, Y1045, Y1068, Y1086 oder Y1173 können dabei modifiziert werden und bestimmen den weiteren Verlauf der Signalweiterleitung.^[2] Je nach Position der Phosphorylierung, werden andere Proteine zur Membran rekrutiert beziehungsweise der Werdegang des EGFR bestimmt. Die Phosphorylierung an Y845 beispielsweise wirkt rein regulatorisch für die Autokatalyse und setzt weitere Phosphorylierungen in Gang. Die Umsetzung von Y1045 zu pY1045 induziert Ubiquitinylierung durch Interaktion mit Cbl und

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

leitet damit die Degradation des Rezeptors ein, während Y1068 den Interaktionspartner Grb2 oder STAT3 zur Membran rekrutiert und damit die MEK/ERK-Kaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren einschaltet.^[284] Je nachdem welche Kaskade aktiviert wird, finden Proliferation, Motilität, Differenzierung oder Apoptose der Zelle statt (Abb. 42).

Neben der Signaltransduktion wird auch die Internalisierung des Rezeptors als Antwort auf Dimerisierung und Aktivierung in Gang gesetzt. Der EGFR wird größtenteils über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert und in Endosomen transportiert. Je nachdem, ob und welche Art der Ligandbindung zuvor stattgefunden hat, wird der Weitertransport abgeändert. Vorhergehende EGF-Bindung führt zum Abbau des Rezeptors in Lysosomen, wohingegen bei Ligand-unabhängiger Dimerisierung oder Dimerisierung mit TGF α , dessen Bindung unter sauren Bedingungen nicht stabil ist, der EGFR zur Membran zurück transportiert und erneut präsentiert wird.^[134] Die Zelle reguliert somit über Degradation und Recycling die Dauer des Signals in Abhängigkeit von der Art und Dauer der Stimulation und kann somit sowohl auf extrazelluläre Reize reagieren, als auch einen homöostatischen Zustand sicherstellen.^[5, 283] Neben der Beschaffenheit des extrazellulären Raums spielt auch die Rezeptorkonzentration auf der Membran selbst eine Rolle in der Rezeptorantwort. Zellen mit erhöhten Rezeptorkonzentrationen von über 10^5 Rezeptoren je Zelle zeigen beispielsweise auch in Abwesenheit von Liganden eine gesteigerte basale Phosphorylierung des EGFR (pEGFR).^[277] Es wurde gezeigt, dass Zellen mit ca. 1.3 Millionen Rezeptoren je Zelle auch ohne EGF-Stimulation in etwa das gleiche Phosphorylierungsniveau aufweisen, wie Zellen sonst unter physiologischen Bedingungen mit Konzentrationen von 4 nM EGF erreichen.^[135] Erhöhte Rezeptorkonzentrationen sind charakteristisch für einige Krebszellen. Die Zelllinie A431 etwa, entnommen aus einem Plattenepithelkarzinom, hat mit ca. $2 \cdot 10^6$ Rezeptoren/Zelle eine sehr hohe Expressionsrate und zeigt eine verstärkte Tendenz zur Oligomerisierung des EGFR in tetrameren und höher geordneten Strukturen. Expressionsraten von ca. $5 \cdot 10^4$ Rezeptoren/Zelle wie im Beispiel von HeLa-Zellen, liegen im mittleren Bereich und führen zu bevorzugter Bildung von EGFR-Dimeren.^[285]

Obwohl Tumorzellen mit erhöhter EGFR-Expression und Ausbildung von EGFR-Oligomeren eine gesteigerte basale Phosphorylierung, also grundlegend einen erhöhten Anteil an pEGFR, besitzen, erwies sich das Vorhandensein intermediärer EGFR-Dimere keinesfalls als ausreichend für eine Aktivierung und Stimulation. Erst die Bindung des Liganden, z.B. EGF, macht aus dem inaktiven Dimer (EGFR) $_2$ eine aktive, autophosphorylierte Spezies (EGFR-EGF) $_2$. Kuriyan *et al.* legten eine intrinsische Autoinhibition nahe, die vermutlich konformationell bedingt ist und erst die Ligandbindung zu einer strukturellen Umorganisation führt, welche eine Kinaseaktivierung ermöglicht.^[135] Die Transmembrandomäne bzw. deren Wechselwirkung in einem EGFR-Dimer sowie die Juxtamembrandomäne scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen.^[286] Die

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

widersprüchlichen Ergebnisse der Notwendigkeit eines Liganden zur EGFR-Aktivierung zu pEGFR trotz beobachteter basaler Ligand-unabhängiger Phosphorylierung, werden der möglichen Aufhebung der intrinsischen Autoinhibition durch höher Oligomere zugesprochen. Die Gruppe um Martin-Fernandez *et al.* postulierte neben der kanonischen Dimerbildung über „rückseits“ gebundene EGF-Monomere eine zusätzliche „frontale“ Wechselwirkung zweier EGF-Rezeptoren (Abb. 42).^[136, 287] Eine ähnliche strukturelle Interaktion ist zwischen EGFR und ErbB3 bekannt und wurde in der molekulardynamischen Simulation für ligandenfreie EGFR-Oligomere für stabil befunden. Eine Oligomerisierung könnte demnach durch Aneinanderreihung von Ligand-ungebundenen EGF-Rezeptoren erfolgen, in welchen nur die äußeren Rezeptoren je ein EGF binden. Dies erwies sich als konsistent mit der Beobachtung, dass Oligomerisierung vor allem mit niedrigen EGF-Konzentrationen in Verbindung gebracht werden kann und eine so genannte „Super-Stöchiometrie“, also viele EGFR im Verhältnis zu wenig EGF, für diese Art der Aktivierung bestimmt wurde.

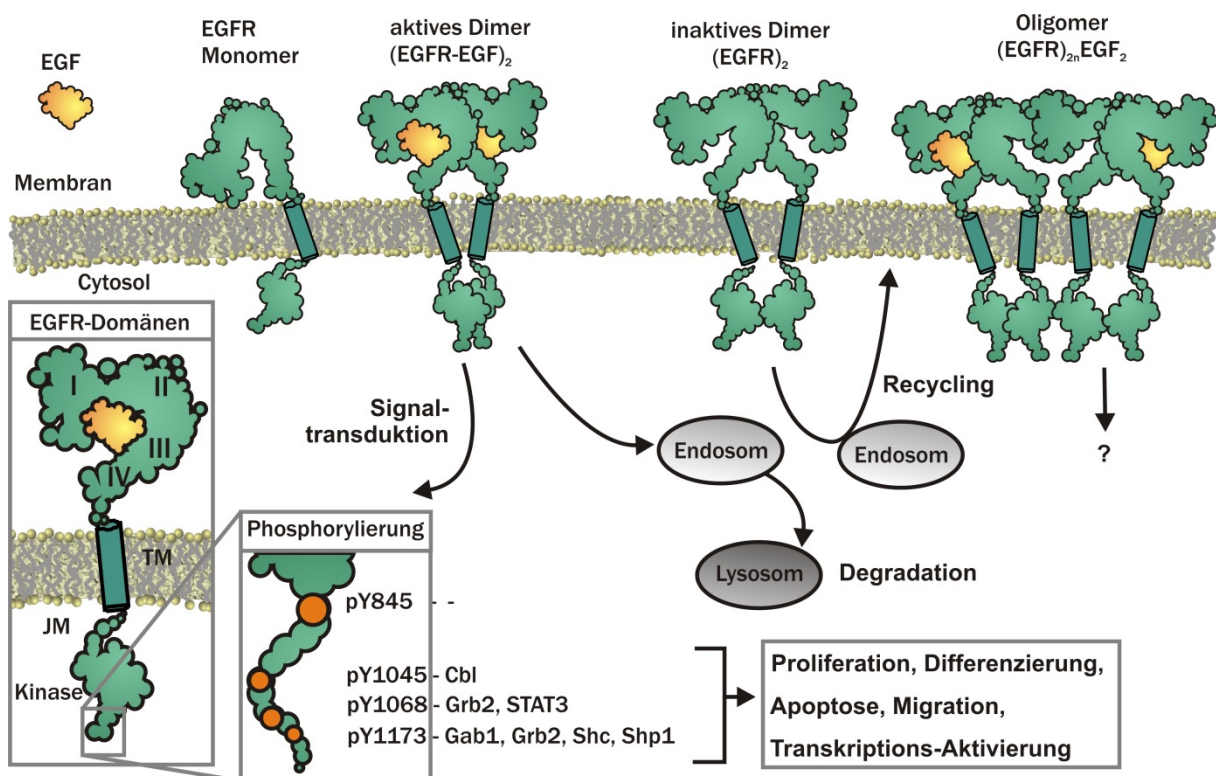


Abb. 42 Aufbau und Weiterleitung des EGFR. Die Bindung des Liganden EGF zwischen Domäne I und III führt zur Bildung des aktiven Dimers, sodass eine Autophosphorylierung *in trans* abläuft. Je nach Phosphorylierungsstelle werden Interaktionspartner gebunden und die entsprechenden Kaskaden aktiviert. Neben der phänotypischen Antwort der Zelle, erfolgt der Abtransport des EGFR-Dimers je nach Bindungsmodus zur Degradation oder zum Recycling.

4.3.1.2) Untersuchungen zur EGFR-Oligomerisierung

Einen besonderen Beitrag zur strukturellen Aufklärung der EGFR-Dimerisierung lieferte die Röntgenkristallstrukturanalyse, mittels welcher die „rückwärts“ gebundene dimere Form der Ligand-assoziierten extrazellulären EGFR-Domänen (sEGFR-EGF)₂ sichtbar wurde.^[130] Es ist weitläufig akzeptiert, dass die Interaktion über den Dimerisierungsarm die konformationelle Ausrichtung der aktiven Spezies an der Zellmembran wiedergibt, da auch molekulardynamische Rechnungen und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Zellen diese Struktur bestätigten. Insbesondere Varianten der Fluoreszenzmikroskopie wie Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) und Fluorophor-Lokalisation mit Photobleichen (*fluorophore localization imaging with photobleaching*, FLIMP) in Kombination mit hochauflösenden mikroskopischen Messtechniken trugen zur Entschlüsselung der EGFR-Aktivierung bei. Ein im Kontext dieser Arbeit bemerkenswertes Beispiel zur Untersuchung des EGFR über FRET zwischen zwei Farbstoffmolekülen, welche über Coiled-Coil-Interaktion am Rezeptor installiert wurden, wurde 2015 von der Gruppe um Matsuzaki *et al.* gegeben und eingangs beschrieben (Kapitel 2.2.2, Abb. 5). Die Markierung mit FRET-Paaren ermöglichte das Auslesen der Dimerbildung in Abhängigkeit von der Stimulation durch EGF.^[121] An dieser Stelle soll betont werden, dass die Dimerbildung (über FRET) und die Phosphorylierung (über Western Blot) separat analysiert werden konnten. Es zeigte sich, dass der Anteil an Rezeptordimeren bereits bei geringen Konzentrationen an EGF zunahm und einen halbmaximalen Wert bei 1 nM EGF-Konzentration ergab. Die Phosphorylierung setzte dazu versetzt erst bei höheren Konzentrationen an Ligand ein und erreichte das Halbmaximum bei 8 nM EGF (Abb. 43A). Dies zeigt eine erstaunliche Übereinstimmung mit der zuvor berichteten Beobachtung von zwei verschiedenen Affinitäten des EGF gegenüber dem EGFR mit Dissoziationskonstanten von $K_D \approx 1$ nM und $K_D \approx 10$ nM.^[287] Eine gängige Erklärung ist die Existenz zweier konformationell verschiedener EGFR-Spezies mit einer hohen (1 nM) bzw. niedrigeren (10 nM) Affinität für den Liganden. Die Gruppe um Pike *et al.* postulierte auf Grundlage von Messungen zur Ligandenbindung direkt auf EGFR-exprimierenden Zellen einen negativen Kooperativitätseffekt (Abb. 43B).^[288] Ein erstes EGF bindet demnach an (EGFR)₂ mit höherer Affinität, als ein zweites EGF an den nun gebildeten (EGFR)₂EGF-Komplex. Die Kinetik des ersten Bindungsschritts sei zudem schneller, als jene des zweiten. Andererseits wurde ebenso von positiver Kooperativität im Zusammenhang mit dem EGFR berichtet, da die Bildung von (EGFR)₂-Dimeren den Rezeptor für die Ligandenbindung vorkoordinieren und selbige begünstigen soll.^[289] Solche gegensätzlichen Ergebnisse können einerseits die Folge verschiedener Messmethoden sein, als auch andererseits komplexe Interaktionsnetzwerke anzeigen, welche über verschiedene Spezies eine Affinitätsänderung und Aktivierung hervorrufen. Insbesondere die Möglichkeiten durch Fluoreszenzmikroskopie wird

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

genutzt, um die Rolle von Di- und Oligomeren in der Heterogenität der Bindungsaffinitäten zu erörtern. Eine häufig eingesetzte Methode ist die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM). Schlessinger und Mellman etwa nutzten anti-EGFR-Antikörperfragmente (Fab) in Konjugation mit CdSe-Quantenpunkten, um über die beobachtete Diffusion auf der Zelloberfläche auf Mono- und Dimere schließen zu können und ermittelten so eine Lebensdauer von 13 s für EGFR-Dimere.^[290] Auch die Untersuchungen von Martin-Fernandez *et al.* zu „rückseits“ und „frontal“ gebundenen Oligomeren basieren unter anderem auf Daten aus der Analyse über TIRFM.^[136] Die Markierung des EGF mit einem Farbstoff und die Messung des EGF-EGF-Abstands über FLImP legte die Existenz von Tetra-, Hexa-, Octa- und Decameren des EGFR nahe. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass Untersuchungen durch Photobleichen, wie FLImP, eine vorhergehende chemische Fixierung der Zellen voraussetzen, was Artefakte vor allem im Rezeptor-Clustering hervorrufen kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass jede einzelne Methode es erlaubt, einen bestimmten Teil des Gesamtbilds abzufragen: i) FRET-Messungen an lebenden Zellen erlauben das Zusammenspiel von Proteinen zu erkennen, sind jedoch über den Försterradius räumlich begrenzt; ii) Bindungsstudien geben zwar Auskunft über die Stärke oder Kinetik einer Bindung, aber nicht über die Struktur der gebundenen Spezies und iii) die hochaufgelöste Mikroskopie erlaubt die hohe Präzision zum Teil auf Kosten der Dynamik des Systems durch Fixierung. Methoden, die den Zusammenhang zwischen Dimerisierung und Aktivierung auf lebenden Zellen wiedergeben oder modulieren können, sind demnach gefragt. Ist der Dimerisierungszustand kontrollierbar, können neue Rückschlüsse gezogen werden.

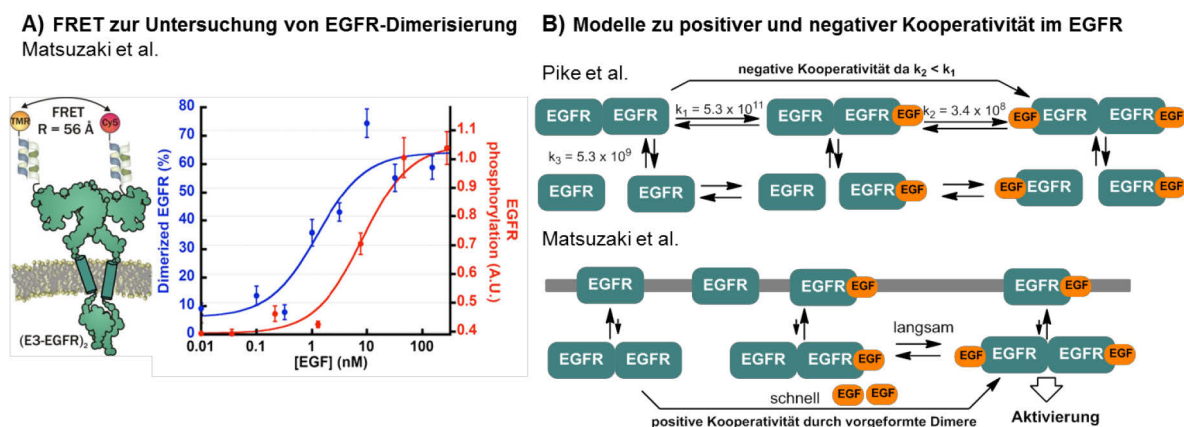


Abb. 43 Untersuchungen und Modelle zur EGFR-Aktivierung. A) Matsuzaki *et al.* nutzen FRET, um die Dimerbildung in Abhängigkeit von der EGF-Konzentration zu bestimmen. Selbst bei sehr niedrigen EGF-Konzentrationen von < 0.1 nM war eine basale Dimerbildung von 10% der Rezeptoren zu verzeichnen. Bei steigenden EGF-Konzentrationen steigt der Anteil an EGFR-Dimeren schneller, als dass Phosphorylierung einsetzt. Bild reproduziert aus *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, H. Yamashita, Y. Yano, K. Kawano, K. Matsuzaki, „Oligomerization–function relationship of EGFR on living cells detected by the coiled-coil labeling and FRET microscopy“, 1359-1366, 2015, mit Erlaubnis von Elsevier.^[121] B) Während Pike *et al.* anhand von Geschwindigkeitskonstanten für einzelne Assoziationsschritte eine negative Kooperativität postulierten, ergänzten Matsuzaki *et al.* dieses Bild um den Schritt der simultanen Ligandbindung an vorgeformte Dimere, womit die Ligand-unabhängige Dimere eine Bindung beschleunigen.

4.3.2) Induzierte EGFR-Dimerisierung durch PNA-Transfer

4.3.2.1) Konzept der induzierten Dimerisierung

In dem vorhergehenden Kapitel 4.2 wurde gezeigt, wie ein PNA-tag auf einem membranständigen Rezeptor aus der Reihe der GPCRs oder auf dem EGFR erfolgreich installiert und durch einen komplementären Oligonukleotidstrang angesteuert werden konnte. Vor dem Hintergrund der bestehenden Unklarheiten in der Rezeptoraktivierung des EGFR und der Rolle vorgeformter Dimere sollte die Methode des PNA-tags genutzt werden, um gezielt EGFR-Dimere auf der Oberfläche lebender Zellen zu erzeugen. Hierfür sollte die 16mer-PNA-Sequenz durch Donor **35** (Abb. 44B) auf den EGFR übertragen und im zweiten Schritt durch eine fluoreszente und zugleich verbrückende DNA gebunden werden (Abb. 44A). Diese „Brücken-DNA“, bestehend aus zwei Teilen des PNA-komplementären Strangs und einem Abstandhalter, sollte in der Lage sein, eine Dimerisierung des EGFR hervorzurufen. Zweierlei Vorteile sollten somit nutzbar gemacht werden: i) die simultane Visualisierung und induzierte Dimerisierung des Rezeptors und ii) die Modulation des Dimerisierungszustands des EGFR unabhängig von der Stimulation durch EGF. Letzteres kann wertvolle Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus des EGFR liefern.

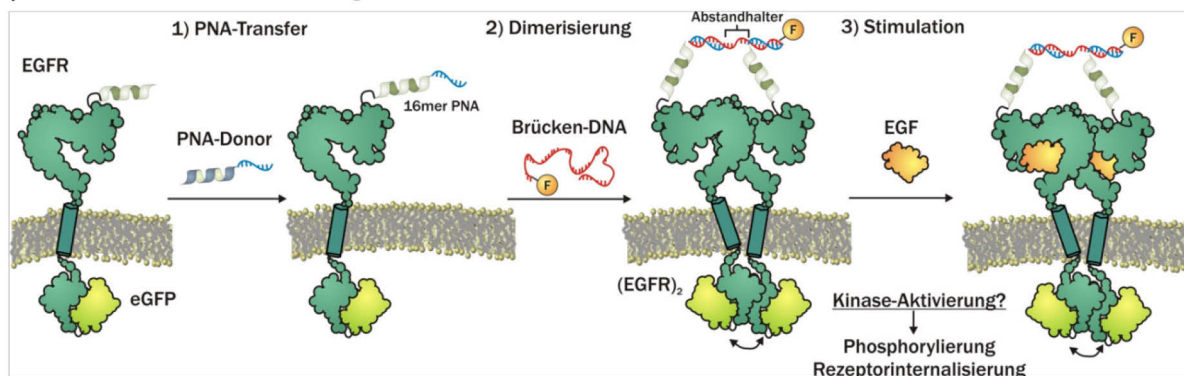
Zur Umsetzung des Konzepts wurde die 16mer-PNA gegenüber der 11mer-PNA bevorzugt, da Experimente zur Rezeptorstimulation eine Temperatur von 37 °C voraussetzen und die 16mer-PNA zur stabileren Duplexbildung mit DNA führt. Aus Kenntnissen über die Struktur von PNA-DNA-Doppelsträngen mit einem Abstand von 3.23 Å und einer Torsion von 28° je Nukleobase wurde abgeleitet, dass die 16mer-PNA eine Länge von 51.7 Å (ca. 5.2 nm) hat und eine Verdrillung um 88° von N- zu C-Terminus bewirkt (Abb. 44C). Dies ist hilfreich zur Abschätzung der Geometrie der verbrückten EGFR-Dimere. Aus Abstandsmessungen von markierten EGF-Liganden geht hervor, dass im Fall einer „rückwärts“ stattfindenden, kanonischen EGFR-Dimerisierung ein Ligand-Ligand-Abstand von 11 nm vorliegt. Für den Fall einer „frontalen“ EGFR-Interaktion betrüge der Abstand nach Modellierung ca. 7 nm.^[136] Trotz der rigiden Struktur von PNA-DNA-Doppelsträngen können Abstände in dem gegebenen Modell nicht präzise eingestellt werden, da die E3-Coiled-Coil-Peptide eine Flexibilität in die Struktur bringen. Zudem wurde es als vorteilhaft erachtet, einen gewissen Spielraum zur strukturellen Ausrichtung des Rezeptors zu bewahren. Es wurden zwei verschiedene „Brücken-DNA“-Stränge verwendet: das Oligonukleotid **56** verfügt über ein, das Oligonukleotid **57** über acht Nukleotide als Abstandhalter (Abb. 44B). Selbst wenn der Abstand eines Nukleotids gering erscheint, so erlaubt diese ungepaarte Stelle ein Abknicken der sonst rigiden Doppelstränge und dient dadurch als Scharnier. Eine Verbindung zweier EGF-Rezeptoren über Brücken-DNA **56** oder **57** soll somit den Dimerzustand räumlich und temporal stabilisieren und könnte in der Folge die

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

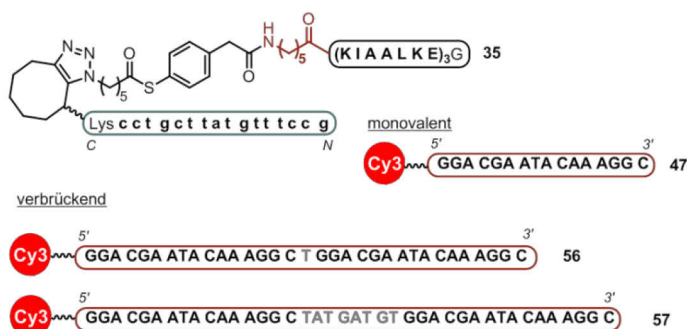
Bildung daraus resultierender Oligomere bevorzugen. Insbesondere auf der zeitlichen Ebene sollte eine PNA-DNA-vermittelte Verbrückung einen Einfluss auf das Rezeptorverhalten haben. Die Stabilität solcher Doppelstränge kann durch die Kinetik der Dehybridisierung abgeschätzt werden, welche durch die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation k_{off} gegeben ist. Für vergleichbar stabile Stränge liegt dieser Wert im Bereich von $k_{\text{off}} = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.^[220, 291] Die Lebensdauer des Duplex ist dann gegeben durch $\tau_{\text{Duplex}} = 1/k_{\text{off}} = 10^5 \text{ s}$ und liegt somit weit über der zuvor erwähnten Lebensdauer von natürlichen Wildtyp-EGFR-Dimeren von $\tau = 13 \text{ s}$.

Was bewirkt eine verlängerte Lebensdauer von $(\text{EGFR})_2$ in Hinblick auf die Aktivierung? Ist eine Aufhebung der intrinsischen Autoinhibition möglich, wenn Lebensdauern von Dimeren artifiziell verlängert werden? In diesem Fall sollte eine gesteigerte Phosphorylierung zu beobachten sein und könnte ein Hinweis auf verlängerte Dimerlebensdauern in der Ligand-unabhängigen Rezeptoraktivierung sein. Krebsvarianten, die EGFR in nicht mutierter Form jedoch verstärkt exprimieren, könnten so das Zellwachstum hochregulieren.

A) PNA-DNA-induzierte Dimerisierung des EGFR



B) PNA-Donor 35 und Cy3-markierte DNA-Stränge



C) Geometrie der Dimerisierung und Verbrückung

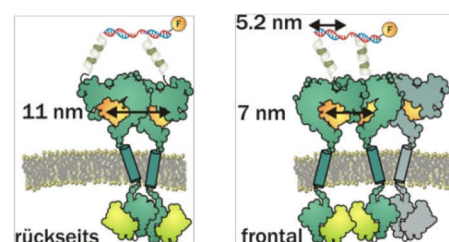


Abb. 44 Konzept der induzierten EGFR-Dimerisierung. A) Im ersten Schritt sollen durch PNA-Transfer EGFR-PNA-Konjugate auf der Zelloberfläche erzeugt werden. Durch Zugabe einer zweifach komplementären Brücken-DNA können Rezeptoren zeitlich und räumlich stabil in Dimeren organisiert werden. Separat von der Dimerisierung kann die Stimulation durch EGF in einem dritten Schritt erfolgen. Zelluläre Effekte wie Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors können für jeden Schritt einzeln ausgelesen werden. B) Nach Transfer der 16mer-Sequenz durch Donor **35** kann diese entweder verbrückend durch DNA **56** oder **57** oder monovalent durch DNA **47** ausgelesen werden. C) Räumliche Orientierung des EGFR bei Dimerisierung und Länge der PNA-DNA-Brücke von 52 Å.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Wie hängt der Anteil an EGFR-Dimeren auf der Zellmembran mit der Phosphorylierung durch EGF zusammen? Die Dimerisierung scheint ein der Phosphorylierung vorgelagerter Prozess zu sein, doch bedeutet mehr (EGFR)₂ gleichzeitig mehr pEGFR?

Was bedeutet die räumliche und temporale Stabilisierung von (EGFR)₂ für die Ligandenaffinität? Ist diese Spezies hoch-affin für EGF ($K_D < 1$ nM) und zeichnet somit das Bild einer positiven Kooperativität oder erfolgt eine Aktivierung erst bei hohen EGF-Konzentrationen ($K_D > 10$ nM) und unterstützt somit das Bild eines gehemmten zweiten Bindungsschritts und einer negativen Kooperativität? Welche Rolle spielen demnach Dimere bei physiologischen Konzentrationen von 4 nM EGF?

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, sollten die Folgeprozesse der Rezeptoraktivierung, nämlich die Phosphorylierung *in trans* und die Internalisierung des Rezeptors in Abhängigkeit der induzierten Dimerisierung beobachtet werden. Die Phosphorylierung lässt sich über biochemische Methoden ermitteln, die auf der Markierung einer bestimmten phosphorylierten EGFR-Spezies pEGFR durch Antikörper basieren. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen pY1068-EGFR gewählt, da diese Phosphorylierung bekannter Weise zur Rekrutierung von Grb2 oder STAT3 führt und somit entweder zu Proliferation (Grb2) oder der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (STAT3). Damit handelt es sich um eine Phosphorylierung mit Aktivierung von nachfolgenden Kaskaden und phänotypischer Relevanz. Als entsprechende Auslesemethoden wurden Western Blot- und Immunofluoreszenz-Analyse gewählt. Ergänzend wurde die Internalisierung des markierten Rezeptors über Fluoreszenzmikroskopie verfolgt.

4.3.2.2) Dimerisierung in der Western Blot-Analyse

Allgemeine Durchführung der Dimerisierungsexperimente

Für die Dimerisierungsexperimente wurde der modifizierte Rezeptor C-E3-EGFR-eGFP wie im vorgehenden Kapitel transient in HEK293-Zellen exprimiert. Diese Zellen besitzen keine besonders hohe EGFR-Expressionsrate, sodass zum einen wenig Interferenz mit dem zelleigenen, unmodifizierten Rezeptor zu erwarten sein sollte und gleichzeitig HEK293-Zellen in der Lage sind, eine Signalweiterleitung durch den EGFR zu ermöglichen, da er Teil des nativen Proteinrepertoires der Zelle darstellt. Die Experimente zur induzierten Dimerisierung wurden wie folgt durchgeführt: HEK293-Zellen wurden in Titerplatten für die Zellkultur mit einer adhäsiven Oberfläche für adhärente Zellen ausgesät und 24 h bei 37 °C kultiviert. Nach der Transfektion durch Zugabe von Vektor und Lipofektamine®2000 ruhten die Zellen über Nacht in Nährmedium. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte anhand des eGFP-Signals festgestellt werden, dass eine brauchbare Expression an Rezeptoren im Zeitraum von 24 – 72 h

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

nach der Transfektion gegeben war. In diesem Zeitfenster wurden die Dimerisierungsexperimente durchgeführt. Sechs Stunden vor dem jeweiligen Experiment wurde das Medium von DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) auf reines DMEM ohne Serum gewechselt. Serum enthält Wachstumsfaktoren wie auch EGF und bewirkt somit eine Stimulation des Rezeptors. Um die Dimerisierung gezielt mit und ohne Einfluss von EGF bzw. unter Gabe von verschiedenen Konzentrationen an EGF untersuchen zu können, müssen die Zellen demnach zuvor unter serumfreien Bedingungen „gehungert“ werden. Das eigentliche Experiment bestand dann aus den drei Schritten 1) PNA-Transfer, 2) DNA-Verbrückung und 3) Stimulation. Die Zellen wurden anschließend auf Eis gelegt, lysiert und der Proteingehalt der Lysate durch den Bradford-Assay bestimmt. Entsprechend verdünnte Lysate wurden in der Western Blot-Analyse untersucht.

Der Western Blot

Die Western Blot-Methode stellt eine gängige biochemische Technik zur spezifischen und quantitativen Analyse von Proteinen dar. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll wurde in Anlehnung an Herstellerangaben und Literatur etabliert.^[57, 138, 280, 292] Der allgemeine Arbeitsablauf wurde dahingehend modifiziert, dass jeweils zwei identische SDS-PAGE-Gele parallel angefertigt wurden (Abb. 45). Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran konnten somit EGFR und die phosphorylierte Variante pEGFR separat ausgelesen werden. Lysisbedingungen und die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels sowie Stromstärke, -spannung und Zeiten für die Elektrophorese wurden optimiert. Der Transfer wurde im Nass-Blot-Verfahren etabliert und das chemolumineszente Auslesen nach Herstellerangabe durchgeführt (siehe optimiertes Protokoll in Kapitel 6.5.4). Zelllysate wurden unter Verwendung von RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% Triton™ X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris) mit Protease- und Phosphatase-Blockern hergestellt. Die Zugabe dieser Additive ist essentiell, um die Phosphorylierung des EGFR quantitativ auswerten zu können. Eine Proteinmenge von 30 µg je Geltasche erwies sich als ausreichend, um EGFR, pEGFR und β -Tubulin als Kontrolle in ausreichender Intensität auszulesen. Eine gute elektrophoretische Trennung zwischen EGFR (ca. 175 kDa) und β -Tubulin (ca. 55 kDa) konnte mit 8%-igem Trenn- und 4%-igem Sammelgel erreicht werden. Es wurde immer eine vorgefärbte Proteinleiter zur Sicherstellung der korrekten Proteinzuordnung und zur besseren Kontrolle des Verlaufs der Elektrophorese genutzt. Der darauf folgende Transfer im Nass-Blot wurde für 45 min bei 100 V mit ca. 210 – 240 mA Stromstärke durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde der jeweilige Blot mit Blockierungspuffer (5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in TBS) vor unspezifischen Interaktionen abgeschirmt. Von den zwei identischen Membranen wurde je eine mit einem Gemisch aus anti-EGFR- / anti-Tubulin-Antikörpern und die andere mit einem Gemisch aus anti-pEGFR- / anti-Tubulin-Antikörpern inkubiert. Die Primärantikörper stammten aus

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Kaninchen und wurden bei 4 °C über Nacht angewandt. Die Membranen wurden gewaschen und mit anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat inkubiert. Die Chemolumineszenz wurde unter Verwendung der Reagenzien *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* ausgelesen.

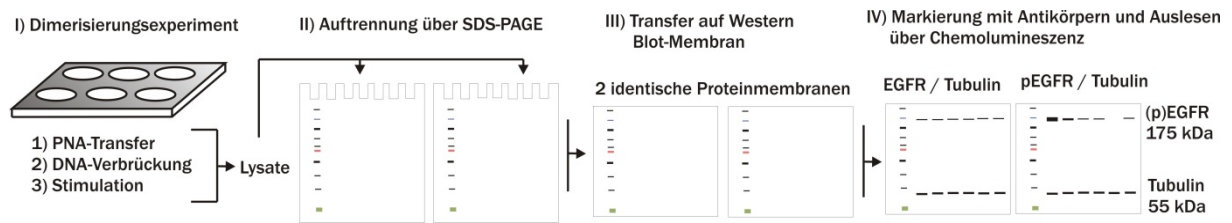


Abb. 45 Schema zur Untersuchung der Rezeptordimerisierung und -aktivierung über Western Blot-Analyse. Proteine der lysierten Zellen aus den Dimerisierungsexperimenten werden aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und über Antikörper mit HRP-Konjugation ausgelesen.

Dimerisierungsexperimente

Erste Experimente wurden in 6-*well*-Titerplatten durchgeführt, da die großen Kavitäten eine hohe Zellzahl erlaubten und somit sichergestellt wurde, dass ausreichend Material zur Lyse vorhanden war. 300,000 Zellen je *well* wurden in den Poly-D-Lysin-beschichteten Platten ausgesät, mit 250 ng Vektor und 2.5 µL Lipofektamin®2000 transfiziert und am darauffolgenden Tag über 6 h gehungert. Die Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch durch Messung der eGFP-Emission verfolgt. In einer initialen Untersuchung sollte der Effekt der Verbrückung auf die Phosphorylierung des EGFR unter An- oder Abwesenheit des Liganden EGF beobachtet werden. Folgende zwei Fragen standen hierbei im Vordergrund: I) Wird die Ligand-abhängige Phosphorylierung gesteigert, wenn der Anteil an Dimeren auf der Zellmembran durch PNA-DNA-Verbrückung erhöht wird? II) Findet eine Erhöhung der basalen Phosphorylierung statt, wenn Dimere auch in Abwesenheit von Ligand gebildet werden? Der PNA-Transfer wurde mit 100 nM Donor **35** über 4 min in PBS-Puffer bei pH 7.0 durchgeführt, die Zellen gewaschen und 500 nM DNA **56** oder **57** bzw. reiner Puffer ohne DNA hinzugegeben. Nach 2 min wurde EGF in einer finalen Konzentration von 20 nM hinzugegeben und die Zellen 10 min bei 37 °C stimuliert. Nach Lyse, SDS-PAGE und Western Blot wurden die chemolumineszenten Banden in ihrer Intensität durch das Programm ImageJ ausgewertet. Dabei wurde jeweils das Signal der einzelnen EGFR-Bande ins Verhältnis zur dazugehörigen Tubulin-Bande und das pEGFR-Signal ins Verhältnis zu der dazu entsprechenden Tubulin-Bande gesetzt (Abb. 46, Gln. 1). Somit erfolgt eine Normierung. Die so bestimmte *Phosphorylierung* $[pEGFR/EGFR]$ gibt das Verhältnis von pY1068-phosphoryliertem EGFR zur gesamten EGFR-Population in einem Experiment wieder. Wichtig für die Auswertung ist der Umstand, dass die Markierung mit anti-EGFR-Antikörper die Gesamtheit der EGFR-Spezies markiert, also neben dem unphosphorylierten auch alle Varianten an aktiviertem pY-haltigem EGFR. Die im nächsten Schritt nach Gleichung 2 errechnete *relative Phosphorylierung* $[pEGFR/EGFR]_{\text{Bandex}}/[pEGFR/EGFR]_{\text{Kontrollbande}}$ gibt dann den jeweiligen Anteil an

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

pEGFR im Verhältnis zum pEGFR-Anteil einer als solchen definierten Kontrollbande wieder. In der Western Blot-Analyse zu den ersten Experimenten, wurde die relative Phosphorylierung auf den unverbrückten Rezeptor mit EGF-Stimulation in Anwesenheit des PNA-tags bezogen (Abb. 46A, grauer Balken 3).

Gleichungen

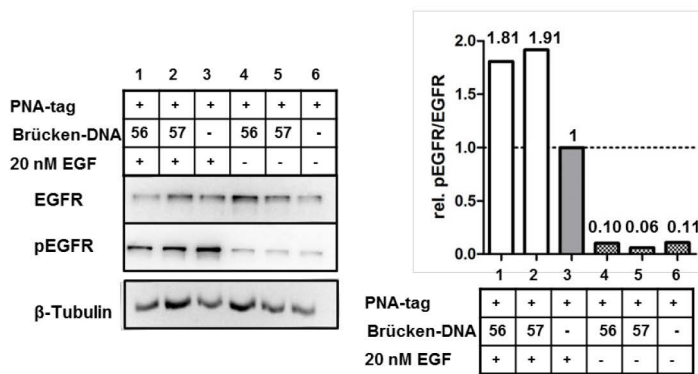
Gln. 1 - Phosphorylierung:

$$\frac{\frac{pEGFR}{Tubulin_{pEGFR}}}{\frac{EGFR}{Tubulin_{EGFR}}} = \frac{pEGFR}{EGFR} \cdot \frac{Tubulin_{EGFR}}{Tubulin_{pEGFR}} = \left[\frac{pEGFR}{EGFR} \right]_{BandeX}$$

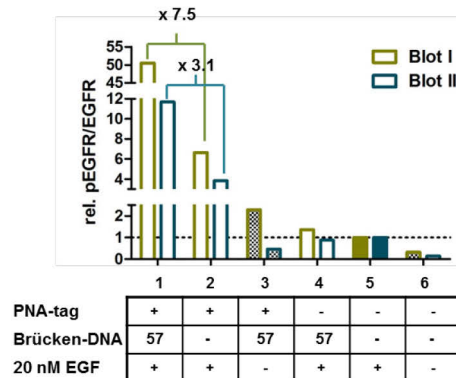
Gln. 2 - Relative Phosphorylierung:

$$rel. pEGFR / EGFR = \frac{\left[\frac{pEGFR}{EGFR} \right]_{BandeX}}{\left[\frac{pEGFR}{EGFR} \right]_{Kontrollbande}}$$

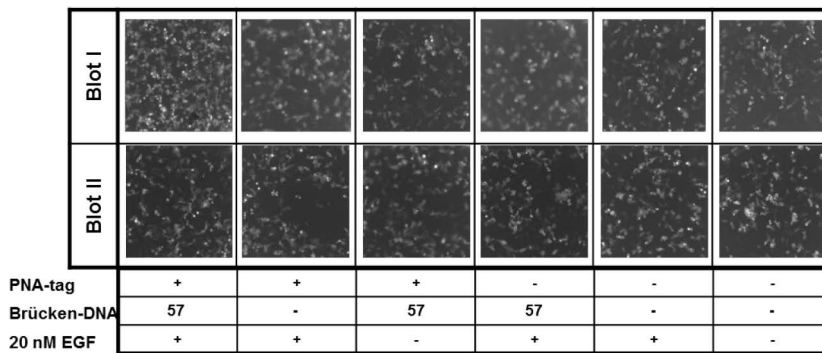
A) Erste Dimerisierungsexperimente



B) Kontrollen in unabhängigen Blots I und II



C) Fluoreszenzmikroskopie im GFP-Kanal



D) Abhängigkeit der Phosphorylierung von der Konzentration an Brücken-DNA

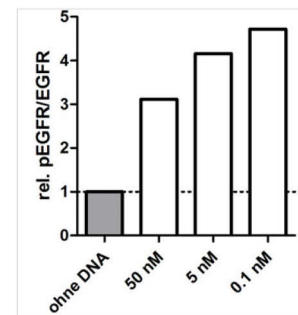


Abb. 46 Western Blot-Analyse und vorhergehende Mikroskopie zur Dimerisierung und Phosphorylierung. Oben: Gleichung zur Ermittlung der Phosphorylierung (Gln. 1) durch Normierung auf das Tubulin-Signal (links). Daraus wird die relative Phosphorylierung errechnet (Gln. 2), indem eine Bande als Kontrollbande definiert wird (rechts). A) Zwei separate Blots werden gegen EGFR (oben) und pEGFR (Mitte) in Gegenwart von anti-Tubulin-Antikörpern ausgelesen. Die ermittelte Phosphorylierung wurde bei PNA-Transfer und EGF-Stimulation auf 1 festgelegt (3, grauer Balken, entspricht Kontrollbande). B) In zwei unabhängigen Experimenten an gehungerten Zellen wurde in zwei Blots die relative Phosphorylierung bei Verbrückung und Stimulation (1), bei PNA-Transfer und Stimulation (2), bei Verbrückung (3), bei DNA-Zugabe und Stimulation (4) im Verhältnis zur reinen Stimulation mit 20 nM EGF (5) und zu gehungerten Zellen (6) ermittelt. C) Betrachtung der Transfektionseffizienz im GFP-Kanal vor den Dimerisierungsexperimenten. D) Stimulation mit 20 nM EGF ohne Transfer oder Brücken-DNA (grauer Balken) im Vergleich zu Stimulation nach Transfer und Verbrückung mit sinkenden Konzentrationen an DNA 57. Ungefüllte Balken – EGF-stimuliert (20 nM); karierte Balken – ohne Stimulation; farbig gefüllte Balken – auf 1 normierter Standard (Kontrollbande).

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Im Vergleich zur PNA-markierten und stimulierten Probe in Abwesenheit von DNA (Abb. 46A, grauer Balken, (3)), zeigte die Verbrückung über DNA, unabhängig vom Abstandhalter, eine beinahe doppelt so hohe relative Phosphorylierung (weiße Balken, (1) und (2)). Wurde die Verbrückung ohne darauf folgende Stimulation durchgeführt (karierte Balken), befand sich die relative Phosphorylierung auf dem Niveau der unbehandelten Probe (6) bei ca. 10% des PNA-markierten, EGF-stimulierten Standards. Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ableiten: I) die induzierte Dimerisierung erhöht die Tendenz zur Phosphorylierung durch Stimulation. II) Diese Tendenz ist unabhängig von der Wahl des Abstandhalters. III) Reine Dimerisierung ohne Stimulation bewirkt keine Aktivierung.

Um eine höhere Zahl an Experimenten unter geringem Materialverbrauch zu ermöglichen, wurden nun 24-*well*-Titerplatten mit je 100,000 Zellen je *well* verwendet. Wesentlich in der zweiten Versuchsreihe sollte sein, dass die Normierung auf 1 nicht für die Kombination aus PNA-Transfer und Stimulation gelten sollte, sondern allein die EGF-Stimulation ohne PNA-Transfer beinhalten sollte (Abb. 46B; farbige Balken 5). Damit sollten mögliche Einflüsse des PNA-tags eruiert werden. Da in den orientierenden Untersuchungen die Länge der verbrückenden DNA unerheblich war, wurden die nachfolgenden Experimente auf die Verwendung von DNA **57** mit acht Nukleotiden Abstandhalter beschränkt. Die Versuchsreihe wurde jeweils doppelt durchgeführt und in den einzelnen Blots „Blot I“ und „Blot II“ jeweils für die Bandenpaare EGFR/Tubulin und pEGFR/Tubulin ausgelesen (Abb. 46B, vollständige Blots in Kapitel 7.6).

Relative Phosphorylierung in Anwesenheit des PNA-tags (Balken 1 – 3): Auffällig ist die erhöhte Phosphorylierung bei PNA-Transfer und DNA-Verbrückung (1). Zwar ist diese Beobachtung qualitativ übereinstimmend mit den Resultaten des vorhergehenden Dimerisierungsexperiments, allerdings ist hier die Phosphorylierung im Vergleich zu PNA-Transfer und Stimulation 3.1- bis 7.5-fach statt 2-fach erhöht. Zudem zeigten beide Blots, dass der PNA-tag allein ohne DNA-Verbrückung bereits eine erhöhte relative Phosphorylierung bewirkt (2). Es könnte gemutmaßt werden, dass die hohe Hydrophobie der PNA zur Aggregation der einzelnen Stränge untereinander und damit zu einer Oligomerisierung ohne Zugabe eines zweifach komplementären Strangs führt. Interessanterweise weist die Verbrückung durch PNA-DNA-Interaktion in Abwesenheit von EGF (3) in beiden Blots zwei unterschiedliche Tendenzen auf: während in Blot I eine leicht erhöhte Phosphorylierung zu erkennen ist, ist sie in Blot II leicht gesenkt. Diese Schwankungen sind allerdings minimal und können Unterschieden in der Transfektionseffizienz zugeschrieben werden.

Relative Phosphorylierung in Anwesenheit des PNA-tags (Balken 4 – 5): DNA und EGF (4), sowie allein DNA oder allein PNA ohne EGF (siehe Kapitel 7.3.4) zeigten keinen Effekt. Die basale relative Phosphorylierung in Abwesenheit von Ligand liegt bei ca. 20% (6) in Bezug zur

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Stimulation (5). Dass der Vergleich von (5) und (6) zu einem schlüssigen Ergebnis führt, kann als Kontrolle der korrekten experimentellen Durchführung gewertet werden.

Dennoch soll an dieser Stelle nochmals die drastisch erhöhte Phosphorylierung bei Verbrückung und Stimulation betrachtet werden (1). Die Werte von 50.5 bzw. 11.7 erscheinen im Gegensatz zum Vergleich von (5) und (6) nicht als sinnvoll. Eine um den Faktor 50 erhöhte Phosphorylierung beispielsweise würde bedeuten, dass die Phosphorylierung unter EGF-Stimulation allein maximal 2% betragen müsste, was wohl nicht den realen Gegebenheiten entsprechen sollte.^[121] Auch ist die Differenz zwischen 50.5 und 11.7 sehr hoch. Beide Unstimmigkeiten lassen sich durch die Transfektion und die zelluläre Antwort auf EGFR-Aktivierung erklären. Die Transfektionseffizienz ist ein entscheidender Parameter, wenn es um die Vermittlung der induzierten Dimerisierung geht. Ist die Transfektionseffizienz hoch, liegen viele modifizierte C-E3-EGFR-eGFP-Moleküle an der Zellmembran vor, sodass nach PNA-Transfer eine hohe Konzentration an PNA-Strängen vorhanden ist. Die Zugabe einer definierten Konzentration an Brücken-DNA führt dann zur optimalen Ausbildung von Verbrückungen, wenn die Stöchiometrie EGFR-PNA : DNA = 2 : 1 vorliegt, also eine hohe Konzentration an PNA. Ist die Transfektionseffizienz allerdings niedrig und damit auch die daraus resultierende Konzentration an PNA an der Zellmembran liegt eher ein Mangel an PNA, also ein Verhältnis von EGFR-PNA < DNA vor. Statt einer verbrückenden Anbindung findet dann eine monovalente Markierung der Rezeptoren in der Stöchiometrie EGFR-PNA : DNA = 1 : 1 statt. Die vor den Dimerisierungsexperimenten gemachten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im GFP-Kanal verdeutlichen, dass im Fall von Blot I eine deutlich höhere Expressionsrate für das Dimerisierungsexperiment vorlag als für Blot II (Abb. 46C, Spalte 1). Daraus ergibt sich eine effizientere Verbrückung und ein höherer Einfluss auf die Phosphorylierung in Blot I als in Blot II, was sich in einem höheren Phosphorylierungsanstieg von 50.5-fach gegenüber 11.7-fach äußert. Um dies zu verdeutlichen wurde die Verbrückung nach Transfektion und PNA-Transfer unter EGF-Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an DNA durchgeführt. Zu erwarten war eine höhere Phosphorylierung bei geringeren DNA-Konzentrationen, da hier die Stöchiometrie von PNA : DNA = 2 : 1 bevorzugt wird. In der Tat konnte ein solcher Trend nachgewiesen werden (Abb. 46D). Wie bereits erwähnt erscheint eine Phosphorylierungserhöhung um das 50.5- bzw. 11.7-fache sehr hoch. Diese Zahlen sind eher als Tendenz zu werten und nicht als eine absolute Phosphorylierungserhöhung. Grund für den hohen Fehler und damit auch die hohen Werte ist die Schwierigkeit, EGFR-Konzentrationen nach Aktivierung zuverlässig im Western Blot auszulesen. Wie in Abb. 46A erkennbar erscheinen EGFR-Banden bei Stimulation mit EGF (Banden 1 – 3) schwächer als ohne Stimulation (Banden 4 – 6). Als Folge der Aktivierung wird der EGFR nicht nur phosphoryliert, sondern auch internalisiert und abgebaut. Je höher der Anteil an aktivierter Spezies, umso stärker die Degradation des Rezeptors und umso schwächer

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

im Ergebnis die EGFR-Bande. Eine EGFR-Bande, die so schwach ist, dass sie vom Hintergrund kaum unterscheidbar ist, führt zur Überbewertung der phosphorylierten Spezies und resultiert damit in überhöhten relativen Phosphorylierungsdaten.

Diskussion

Es wurde ein experimentelles Vorgehen etabliert, welches in den zwei Schritten (PNA-Transfer und DNA-Verbrückung) die Dimerisierung von EGF-Rezeptoren herbeiführt. Der deutliche Einfluss dieser Verbrückung konnte über Western Blot-Analyse demonstriert werden. Dabei wurde der Anteil an pY1068-phosphorylierten EGFR-Spezies als Anteil am Gesamt-EGFR ermittelt und Relation zu einem auf eins normierten Standard ausgewertet. In Hinblick auf die vorab gegebenen Fragestellungen lassen sich aus der Western Blot-Analyse folgende Schlüsse über die Rolle von Dimeren in der EGFR-Aktivierung ziehen: I) wenn zuvor eine Rezeptordimerisierung artifiziell herbeigeführt wird, erhöht sich der Anteil an phosphoryliertem EGFR bei Stimulation mit 20 nM EGF. Dimere scheinen demnach eine Aktivierung zu begünstigen. II) der PNA-tag führt auch ohne Zugabe von verbrückender DNA zu einer geringfügigeren Sensitivierung des EGFR für EGF. Dieses Verhalten kann derzeit nicht mit Sicherheit erklärt werden. Es ist denkbar, dass hydrophobe Interaktionen zwischen PNA-tags eine Verbrückung von EGF-Rezeptoren begünstigen. III) Die Dimerisierung allein, ohne Zugabe von Ligand wies keine reproduzierbar erhöhte Phosphorylierung auf. Demnach ist eine temporal verlängerte und räumlich arretierte Dimerisierung nicht ausreichend, um die intrinsische Autoinhibition zu umgehen, was in Übereinstimmung mit bisherigen Beobachtungen ist.^[138]

Trotz der aufschlussreichen Befunde, die im späteren Teil der Arbeit tiefergehend diskutiert werden, müssen einige Schwächen der Versuchsführung kritisch beleuchtet werden. Dazu gehört die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Transfektionseffizienz, welche von Experiment zu Experiment variieren kann. Nicht nur werden nur einige Zellen der gesamten Zellpopulation transfiziert, sondern zudem herrscht auch eine Heterogenität in den Expressionsraten von einer zur anderen transfizierten Zelle. Zudem wird die EGFR-Bande mit zunehmender Aktivierung schwächer und kann nicht mehr eindeutig ausgelesen werden. Überhöhte Werte für den verbrückungsbedingten Phosphorylierungsanstieg sind die Folge. Um diese Schwächen zu umgehen und den Einfluss der induzierten Dimerisierung über eine alternative Methode zu bestätigen, wurde ein Immunofluoreszenz-Assay etabliert.

4.3.2.3) Dimerisierung im Immunofluoreszenz-Assay

Der Immunofluoreszenz-Assay

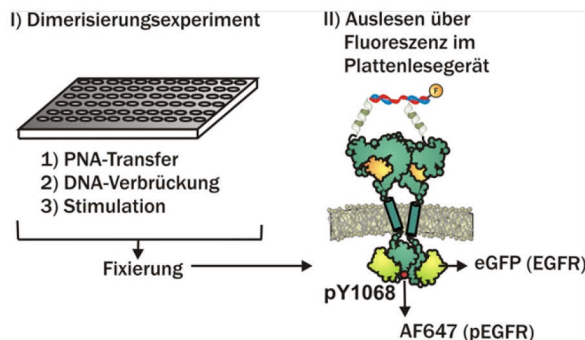
Als Alternative zur Western Blot-Analyse sollten Dimerisierungsexperimente in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt und die Expression und Phosphorylierung direkt in den Platten ausgelesen werden. Das generelle Vorgehen ist in Abb. 47A dargestellt: ausplattierte, transfizierte Zellen wurden analog den vorhergehenden Dimerisierungsexperimenten 6 h gehungert und die Schritte PNA-Transfer, DNA-Verbrückung und EGF-Stimulation durchgeführt. Die Zellen wurden mit 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Platte gegen unspezifische Interaktionen der Antikörper blockiert. Der hierfür verwendete Puffer enthielt Serum eines Wirts, in diesem Fall Ziegen Serum, welches komplementär zur Spezifität der verwendeten Antikörper war. Die Zellen wurden durch Zugabe von Triton-X permeabilisiert und mit dem Primärantikörper gegen pEGFR inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-Kaninchen-IgG-Konjugat mit dem Farbstoff AlexaFluor 647 (AF647) verwendet. Dieser Fluorophor mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen von $\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$ kann ohne Überschneidung mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen von GFP von $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$ ausgelesen werden. Die Intensität des AF647-Signals gibt Auskunft über die relative Menge an pEGFR, während das GFP-Signal die Menge an Gesamt-EGFR kennzeichnet. Diese Art der Phosphorylierungsbestimmung bietet gegenüber dem Western Blot mehrere Vorteile. Zum einen ermöglicht die Arbeit im Mikrotiterplattenformat eine schnelle Durchführung von Mehrfachmessungen, womit Schwankungen in den Expressionsraten statistisch ausgeglichen werden können. Zudem erfolgt das Auslesen direkt an den Zellen, womit Zwischenschritte, wie etwa Transfer oder Lysis als Einflussfaktoren auf das Ergebnis ausgeschlossen werden können. Die Methode erwies sich außerdem als sensitiver, sodass selbst bei einer internalisierungsbedingt gesenkten Konzentration an Gesamt-EGFR die relative Menge weiterhin zuverlässiger aus dem eGFP-Signal abgelesen werden konnte.

Zu Beginn der Durchführung wurden verschiedene Platten verglichen und eine Kalibrierung der Signalintensität von GFP und AF647 vorgenommen und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (siehe Kapitel 6.5.5). Die HEK293-Zellen wurden in unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät, transfiziert und das Fixierungs- und Ausleseprotokoll ohne Dimerisierungsexperiment getestet. Das Signal für AF647 verlief wie erwartet proportional zum Signal der absoluten Zellpopulation, da eine hohe EGFR-Expression bei gleicher basaler Phosphorylierung eine hohe absolute Menge an pEGFR bewirkt (Abb. 47B). Wurden 5,000 Zellen je well ohne Transfektion ausgesät, so lag das GFP-Signal etwas unter dem Signal für 2,500 Zellen je well mit Transfektion. Dies entspricht also ungefähr der Detektionsgrenze, an der das GFP-Signal nicht mehr vom Hintergrund unterscheidbar ist. Um ein möglichst zuverlässiges Signal ohne

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Überpopulation der Zellen zu ermöglichen wurden 10,000 Zellen je *well* als optimal für alle folgenden Experimente erachtet.

A) Immunofluoreszenz-Assay



B) Kalibrierung der Zellzahlen

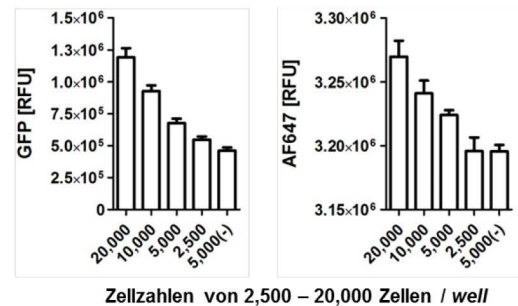


Abb. 47 Etablierung des Immunofluoreszenz-Assays. A) Schema zur Durchführung der Dimerisierungsexperimente als Dreifachmessungen in 96-*well*-Mikrotiterplatten gefolgt von dem direkten Auslesen in den Platten nach Fixierung und Markierung des phosphorylierten Spezies mit eine AF647-konjugierten Sekundärantikörper. B) GFP- und AF647-Signale bei verschiedenen transfizierten Zellzahlen von 20,000 – 2,500 bzw. bei 5,000 Zellen ohne Transfektion (5,000(-)). Filtereinstellung im Plattenlesegerät: GFP λ_{ex} = 480 nm und λ_{em} = 535 nm; AF: λ_{ex} = 640 nm und λ_{em} = 665 nm. RFU – *relative fluorescent units* (relative fluoreszenzte Einheiten)

Ergebnisse der Dimerisierung

Für Dimerisierungsexperimente wurde analog der Versuchsführung im Western Blot verfahren, indem die Zellen in Poly-D-Lysin-vorbehandelten *wells* in der sterilen Mikrotiterplatte ausgesät, am darauf folgenden Tag mit 100 ng Vektor und 1 μ L Lipofektamin je Kavität in OptiMEM® transfiziert und sechs Stunden vor der Dimerisierung gehungert wurden. Der PNA-Transfer wurde mit 100 nM Donor **35** für 4 min in PBS-Puffer pH 7.0 durchgeführt, die Zellen wurden gewaschen und mit 100 nM Brücken-DNA **56** oder monovalenter DNA **47** die Dimerisierung induziert. Nach 2 min wurde EGF in einer finalen Konzentration von 20 nM hinzugegeben und die Zellen für 10 min bei 37 °C gehalten. Die Zellen wurden gewaschen und mit 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die *wells* wurden nach Blockierung und Antikörperbehandlung wie beschrieben am Plattenlesegerät im GFP- und AF647-Kanal ausgelesen und die relative Phosphorylierung durch den Quotienten aus $\text{AF647/GFP} = \text{pEGFR/EGFR}$ ermittelt. Die Normierung erfolgte in Bezug zu jenen Zellen, die weder mit einem PNA-*tag* ausgestattet noch mit DNA inkubiert, sondern allein durch EGF stimuliert wurden. Nicht nur wurden sämtliche Messungen als Dreifachreplikate durchgeführt, sondern der Assay wurde zudem in zwei unabhängigen Versuchen, Assay I (grün) und Assay II (blau) durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit aufzuzeigen (Abb. 48A). Wurde eine Dimerisierung durch Zugabe von DNA **56** vor der Stimulation induziert, konnte erneut ein erhöhter Anteil an phosphoryliertem

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Rezeptor von 1.76- bzw. 1.81-fach beobachtet werden. Wurde anstelle der Brücken-DNA, 200 nM monovalente DNA 47 hinzugegeben gab es keinen derartigen Effekt. Dies belegt nicht nur die Notwendigkeit an Proximitätserhöhung, sondern zeigt auch, dass die Zugabe von negativ geladener komplementärer DNA die Aggregation von PNA und dadurch bedingt erhöhte Phosphorylierung unterbinden kann. Erstaunlicherweise, erwies sich allerdings die basale Phosphorylierung als vergleichsweise hoch. Dies kann dem Umstand zugeschrieben werden, dass in den kleinen Kavitäten von 96-*well*-Mikrotiterplatten das serumhaltige Medium nicht

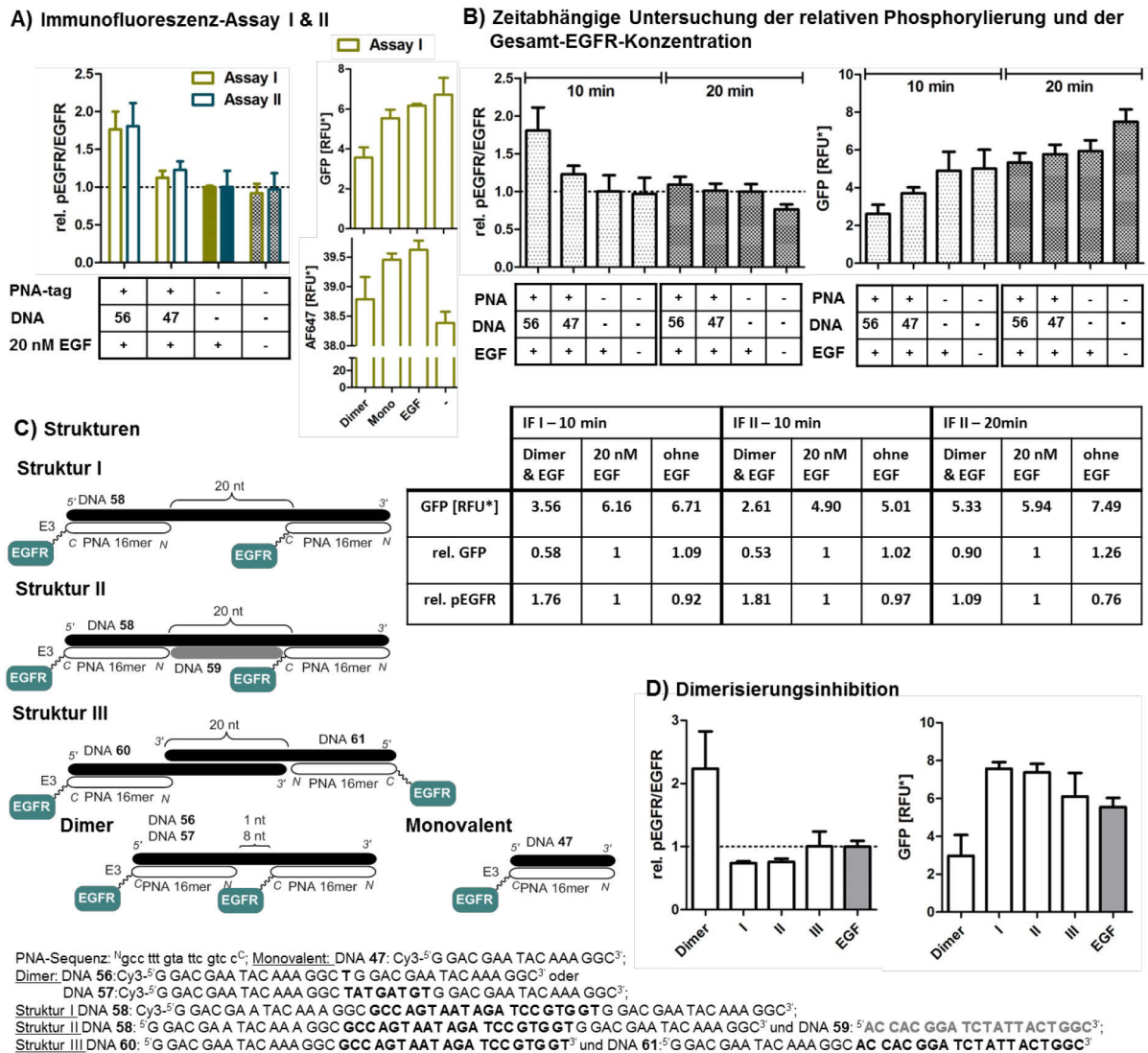


Abb. 48 Immunofluoreszenz-Untersuchungen zur induzierten Dimerisierung / Inhibition und EGF-Stimulation. A) Vergleich von Assay I und II zur relativen Phosphorylierung als Quotient aus pEGFR/EGFR = AF647/GFP (links). Einzelmessungen von GFP- und AF647-Signal für Assay I (rechts). Es erfolgte eine Normierung auf eins bezüglich der EGF-Stimulation ohne PNA-Transfer oder DNA-Inkubation. B) Vergleich des Dimerisierungseffekts nach 10 und 20 min Stimulation mit EGF in GFP-Kanal (rechts) und daraus ermittelter relativer Phosphorylierung (links). Tabellarisch zusammengetragen sind die absolute (obere Zeile) und relative (mittlere Zeile) Gesamt-EGFR-Menge und der relative pEGFR-Anteil in Bezug auf reine EGF-Stimulation. C) Verwendete Strukturen und Sequenzen. D) Absolutes GFP-Signal und daraus abgeleitete relative Phosphorylierung für die Verwendung der in C) gezeigten Strukturen (Dimer = 57) für 2 min vor und während der Stimulation mit 20 nM EGF für 10 min bei 37 °C. [RFU*] = [RFU]/100,000.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

restlos entfernt werden konnte, ohne die Zellen zu schädigen. Die verbleibende Konzentration an Wachstumsfaktoren führte zu einer weiterhin hohen basalen Phosphorylierung. In der Betrachtung des GFP- und AF647-Signals separat am Beispiel von Assay I (Abb. 48A, rechts) ist für den unstimulierten Fall zu erkennen, dass wie erwartet die absolute Phosphorylierung gesenkt und die Gesamt-EGFR-Menge erhöht ist. Im Umkehrschluss deutet dies nochmals auf die Relevanz der Dimerisierung zur Aktivierung hin, da selbst unzureichend gehungerte Zellen mit hoher basaler Phosphorylierung durch induzierte Dimerisierung in ihrem Anteil an pEGFR erhöht werden.

Nachdem die Ergebnisse die vorhergehenden Beobachtungen aus dem Western Blot bestätigten, sollten nun zum einen der Einfluss der Dimerisierung auf die Gesamtkonzentration an EGFR und zum anderen der zeitliche Verlauf der EGFR- und pEGFR-Anteile untersucht werden. Bereits im Western Blot wurde deutlich, dass es bei Aktivierung zu einer Intensitätsabnahme der Bande an Gesamt-EGFR kam. Im Immunofluoreszenz-Assay wird die Menge an Gesamt-EGFR in den Zellen durch das GFP-Signal verzeichnet und ist in Abb. 48B dargestellt. Eine Absenkung um fast die Hälfte an Gesamt-EGFR ist zu verzeichnen, wenn Dimerisierung und Stimulation vorgenommen wurden. Dieser Zusammenhang ist in relativen Zahlen in der Tabelle in Abb. 48B zu sehen. Das GFP-Signal in Assay I und II beträgt das 0.58- bzw. 0.53-fache des PNA- und DNA-unabhängig stimulierten GFP-Signals. Ohne Stimulation liegt mit Faktor 1.09 und 1.02 eine leicht erhöhte Menge an EGFR vor. Die gleiche Versuchsanordnung wurde wiederholt, mit dem Unterschied, dass nach Zugabe von Brücken-DNA die Stimulation mit 20 nM EGF auf 20 min verlängert wurde. Weder im GFP-Signal noch in der ermittelten relativen Phosphorylierung pEGFR/EGFR lässt sich nun ein Unterschied zwischen dimerisiert und stimuliert bzw. nur stimuliert erkennen. Im Gegensatz dazu ist in der Anordnung ohne EGF- Zugabe eine deutlich gesenkte Phosphorylierung und erhöhte EGFR-Expressionsrate zu erkennen. Durch die Waschschrte mit Puffer wurde das verbleibende Serum entfernt und nach 20 min beginnt das allmähliche Absinken des Anteils an pEGFR und eine Hochregulierung an Gesamt-EGFR in der Zelle.

Diese Resultate belegen, wie durch induzierte Dimerisierung die Aktivierung des EGFR verstärkt werden konnte. Umgekehrt könnte nun angenommen werden, dass eine inhibierte Dimerisierung durch Verfestigung eines Abstands zwischen einzelnen Rezeptoren zu einer verminderten Phosphorylierung führen könnte. Es sollte im nächsten Schritt also untersucht werden, ob die Markierung mit PNA und die Verbrückung über eine rigide DNA-Struktur, die keine Annäherung zweier Rezeptoren erlaubt, einen Einfluss auf die relative Phosphorylierung hat oder sogar als Inhibitor der EGFR-Aktivierung fungieren könnte. So wurden drei verschiedene DNA-Gerüste (Abb. 48C **I**, **II** und **III**) entworfen, welche die PNA-komplementären Regionen über eine lange Oligonukleotidsequenz verbrückten. Während in Struktur **I** der 20-Nukleotid-lange Abstandhalter ungepaart vorliegt, wird in Struktur **II** diese Sequenz zur

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Ausbildung eines rigiden Doppelstrangs unter Zugabe von DNA **60** genutzt. Damit kann der Einfluss der Rigidifizierung untersucht werden. In Struktur **III** ist der rigide Abstandhalter auch ein 20-Nukleotid-langer Doppelstrang, allerdings ist hier der Abstand der Rezeptoren noch größer. Strukturen **II** und **III** würden somit einen Abstand von jeweils ca. 12 und 17 nm zwischen den Rezeptoren erzeugen. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden alle Strukturen mit einer Konzentration von 100 nM bezogen auf zwei EGFR-Bindungsstellen verwendet (z.B. 100 nM Brücken-DNA **57**). Im Fall von Struktur **III** wurden demnach je 100 nM DNA **61** und 100 nM DNA **62** eingesetzt. Das Dimerisierungsexperiment wurde auf analoge Weise durchgeführt und die Zellen nach 2 min DNA-Inkubation für 10 min mit 20 nM EGF bei 37 °C inkubiert. Die Signale im GFP-Kanal und die ermittelte relative Phosphorylierung pEGFR/EGFR sind in Abb. 48D dargestellt. Es konnte bei Verbrückung mit acht Nukleotiden Abstandhalter wie zuvor eine Verdopplung an pEGFR/EGFR und eine Degradation an Gesamt-EGFR verzeichnet werden. Dieser positive Verbrückungseffekt entfiel, wenn ein langer Abstandhalter von 20 Nukleotiden verwendet wurde. Dies ist konsistent mit Beobachtungen aus der Gruppe um Sando *et al.*, welche bei der Verbrückung von Met-bindenden Aptameren durch DNA-Stränge ebenfalls feststellten, dass lange Oligonukleotidstränge einen geringeren Dimerisierungseffekt auf die adressierten Rezeptoren bewirkten, als kurze Sequenzen (siehe dazu Kapitel 2.3.2. Abb. 7).^[140] Tatsächlich ist eine leicht gesenkte relative Phosphorylierung und eine etwas erhöhte Gesamt-EGFR-Konzentration im Fall von Struktur **I** und **II** zu erkennen. Der Anteil an pEGFR beträgt das 0.74- bzw. 0.76-fache im Vergleich zur EGF-Stimulation. Die Abstandsvergrößerung zwischen einzelnen EGFR-Molekülen führt im Gesamtbild also zu einer leicht verminderten relativen Phosphorylierung. Dass der Effekt nicht stärker ausfällt ist nicht unerwartet, da bei einer hohen Expressionsrate, wie sie bei transient transfizierten Zellen besteht, eine hohe Rezeptorkonzentration vorliegt und somit für ein verbrücktes EGFR-Paar genügend weitere Interaktions-partner in räumlicher Nähe sind.

Diskussion

Es konnte im Immunofluoreszenz-Assay bestätigt werden, dass eine Verbrückung über PNA·DNA-Interaktion bei Stimulation mit 20 nM EGF zu einer erhöhten Phosphorylierung führt. Da beide Dreifachmessungen einen Anstieg um den ungefähren Faktor zwei ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass sich der Anteil der phosphorylierten Spezies bei 20 nM EGF-Stimulation durch vorhergehende Dimerisierung verdoppelt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Zugabe von monovalenter DNA **47** der durch die PNA-*tags* ausgelösten Aggregation entgegenwirken kann. Aus der zeitlichen Betrachtung der Phosphorylierung und Rezeptor-degradation zeigte sich, dass nach 20 min der Ausgangszustand wieder hergestellt und damit

das primäre Signal durch die Zelle ausgeschaltet wurde. Das Absenken der Gesamt-EGFR-Konzentration durch Internalisierung und Degradation, wie es bereits aus den schwachen Banden im Western Blot vermutet wurde, konnte im Absenken des GFP-Signals erneut beobachtet werden. Um den Verlauf der Internalisierung und den Effekt der Dimerisierung auf die EGFR-Verarbeitung in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an EGF zu untersuchen, wurden Experimente in der Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen.

4.3.2.4) Dimerisierung & Internalisierung in der Fluoreszenzmikroskopie

Zeitlicher Verlauf der Internalisierung mit induzierter Dimerisierung

Ein wesentlicher Vorteil der Markierung und Dimerisierung über einen installierten PNA-tag gegenüber vielen anderen Methoden besteht darin, dass beides simultan ausgeführt werden kann, wenn die im zweiten Schritt verwendete DNA mit einem Farbstoff wie etwa Cy3 markiert ist. So kann nicht nur die Expression des modifizierten C-E3-EGFR-eGFP im GFP-Kanal in der Fluoreszenzmikroskopie betrachtet werden, sondern auch speziell die Internalisierung der Cy3-markierten Rezeptoren. Da die vorhergehenden Untersuchungen über Western Blot und Immunofluoreszenz einen klaren Zusammenhang zwischen der Aktivierung und einer Abnahme in der Gesamt-EGFR-Konzentration aufzeigten, sollte über Fluoreszenzmikroskopie dieser Internalisierungsprozess markierter Rezeptoren verfolgt werden. Hierfür wurden wie zuvor 8-well-Träger von *ibidi* verwendet, die nach Poly-D-Lysin-Beschichtung mit je 10,000 Zellen je well besetzt und transfiziert wurden. Je nach Experiment wurden die Zellen wahlweise über sechs Stunden gehungert. Die Zellkerne wurden durch Behandlung mit dem Farbstoff Hoechst33342 für 10 min bei 37 °C angefärbt, die Zellen für 2 min mit TCEP-Lösung behandelt und durch Zugabe von 100 nM Donor **35** in PBS-Puffer bei pH 7.0 mit dem PNA-tag versehen. Es folgte die Markierung mit Brücken-DNA **56** bzw. **57** mit je einem oder acht Nukleotiden Abstandhalter oder der monovalenten DNA **47** in einer Konzentration von 200 nM. Wie in vorhergehenden Markierungsexperimenten aus Kapitel 4.2 wurde die Inkubation für 5 min bei 25 °C vorgenommen, bevor die Zellen gewaschen und mit 20 nM EGF über 5 min bei 37 °C stimuliert wurden. Die Zellen wurden erneut gewaschen und bei 25 °C in der Mikroskopie mit 60-fach vergrößerndem Objektiv am Inversmikroskop IX83 von *Olympus* untersucht. Aufnahmen wurden als Z-Stapel-Experimente durchgeführt und durch Wiener-Dekonvolutionsmethode zu einem rauscharmen Bild verrechnet. Zunächst wurde die Markierung an gehungerten Zellen überprüft. In diesem Fall war keine signifikante Internalisierung zu erwarten. Wie die Aufnahmen in Abb. 49A (links) belegen, ist eine Markierung der Membran durch den DNA-verknüpften Farbstoff Cy3 zu erkennen. Diese Markierung bleibt bei Verwendung der

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

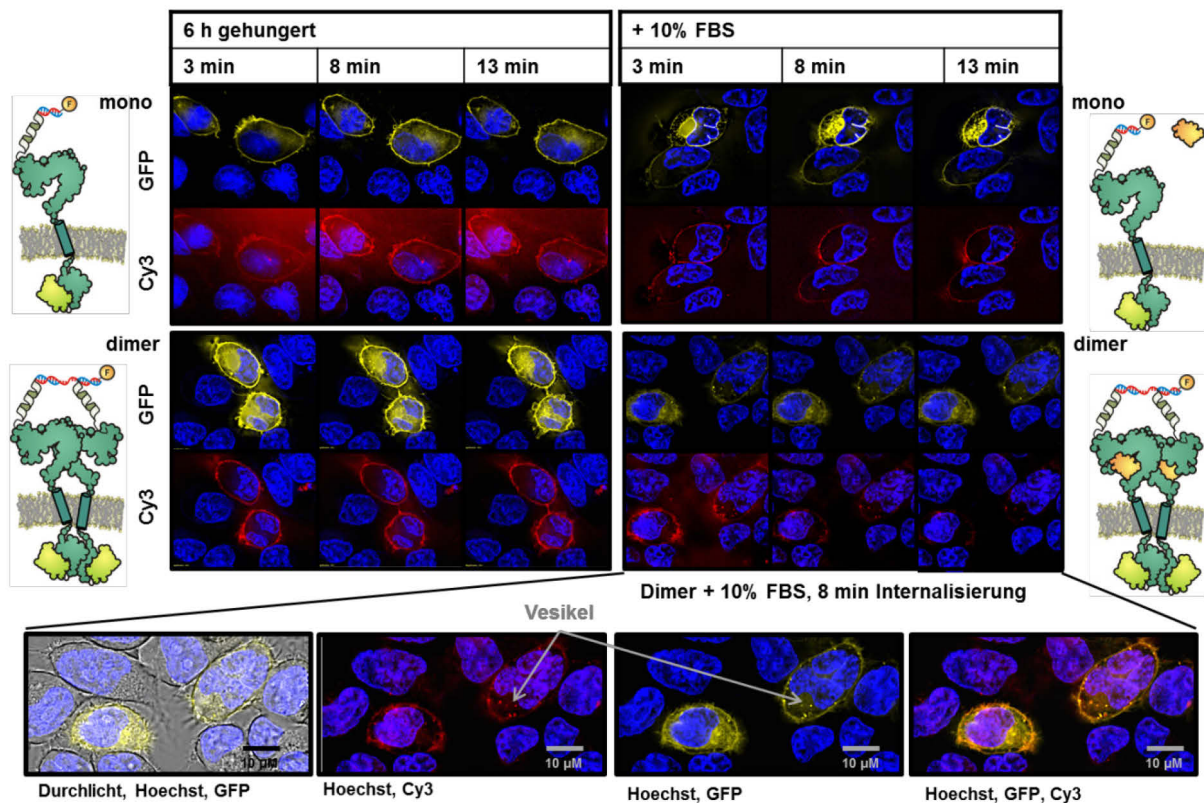
verbrückenden, wie auch der monovalenten DNA im Zeitraum von 13 min nach Waschen der Zellen stabil und an der Membran lokalisiert. Wurden die Zellen vor der Dimerisierung nicht gehungert und war demnach noch EGF vorhanden traf dies nur noch auf die Anwendung der monovalenten DNA **47** zu (Abb. 49A, rechts oben). Wurden die Zellen durch DNA **56** mit einem Nukleotid Abstandhalter verbrückt, ist die Bildung von Cy3-markierten Strukturen im Zellinneren zu erkennen. Kleinere zirkuläre Strukturen, die ebenfalls im GFP-Kanal zu sehen sind, deuten die Internalisierung und Anreicherung in Endosomen an, welche mit ca. 1 μm Durchmesser gut in der Mikroskopie erkennbar sind. Dies bedeutet: i) Geringe Mengen an EGF bewirken erst eine sichtbare Internalisierung, wenn die Dimerisierung begünstigt wird; ii) Dimerisierung führt erst zur erkennbaren Internalisierung, wenn Restmengen an EGF vorhanden sind. Letzteres ist dem Umstand geschuldet, dass Ligand-ungebundene Dimere eine 10-fach langsamere Internalisierung aufweisen, als ligandtragende EGFR.^[134] Die verstärkte Internalisierung kann demnach mit der erhöhten Aktivierung, wie sie im Western Blot und in der Immunfluoreszenzanalyse beobachtet wurde, korreliert werden. Es ist anzumerken, dass sich im zeitlichen Verlauf weitere kreisförmige Strukturen mit deutlich größerem Durchmesser bilden. Diese Bläschen sind vermutlich entweder Teil der Apoptose, also des programmierten Zelltods oder eines zellulären Reparaturmechanismus, in welchem Verletzungen in der Zellmembran abgeschnürt und abgekapselt werden. Um sicherzugehen, dass die eventuell apoptotische Bläschenbildung nicht in Zusammenhang mit der PNA-DNA-Verbrückung steht, wurde als Kontrolle das Markierungsprotokoll auf analoge Weise allerdings ohne PNA, DNA oder EGF durchgeführt. Das heißt, die Zellen wurden in PBS-Puffer unter den gleichen Temperaturbedingungen und Zeitspannen gehalten. Vor allem bei zuvor gehungerten Zellen konnte die Bläschenbildung sehr stark beobachtet werden und trat zudem unabhängig von der Transfektion auf (Abb. 49C). Bestrahlung, Mangel an Nährstoffen im Puffer und eine nichtphysiologische Temperatur von 25 °C sind also wahrscheinlichere Gründe für den programmierten Zelltod, als die vorgestellte Dimerisierungsmethode.

EGF-Abhängigkeit der Internalisierung mit induzierter Dimerisierung

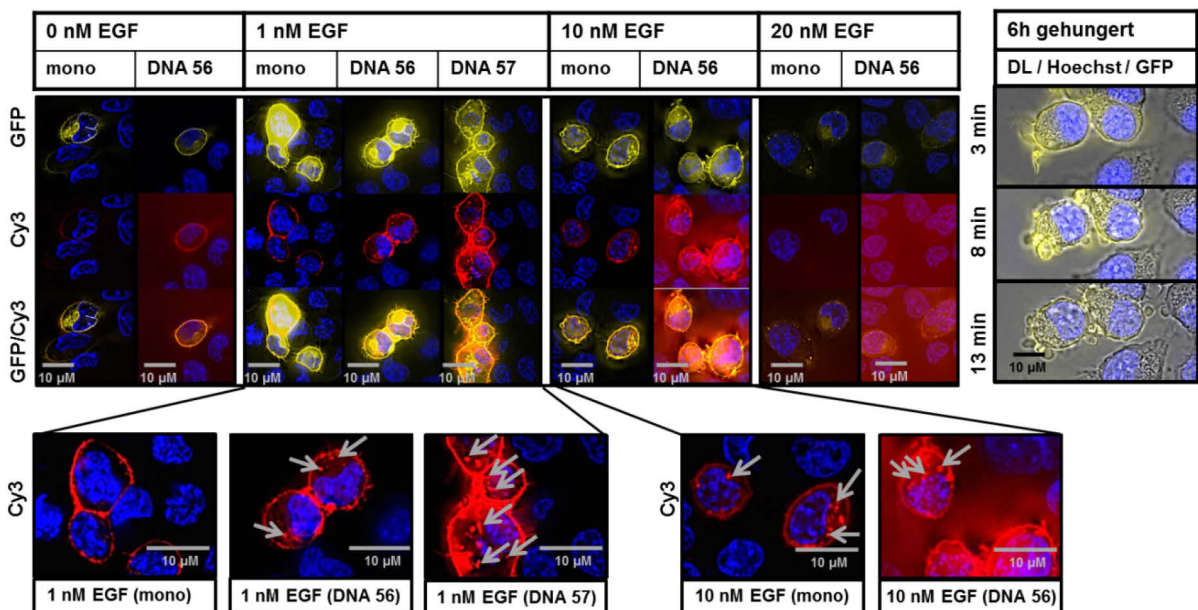
Es kann aus dem Unterschied im Internalisierungsverhalten bei Dimerisierung gegenüber der monovalenten Markierung geschlossen werden, dass die Bildung von Dimeren die Rezeptoren zur Bindung von EGF, wenn auch nur in geringen Konzentrationen vorhanden, vorbereitet und vororganisiert. Ist kein EGF vorhanden, so bleibt ein Effekt aus, wie sich bereits im Western Blot (Abb. 46A, (4) und (5)) zeigte. Im Kontext der EGFR-Aktivierung wurden sowohl positive als auch negative Kooperativität beschrieben, um die Heterogenität der apparenten EGF-Bindungsaffinitäten gegenüber dem Rezeptor zu erklären. Es wurde davon ausgegangen, dass sowohl eine hochaffine EGFR-Spezies mit einer Affinität von $K_D < 1 \text{ nM}$ als

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

A) Zeitabhängige Internalisierung des EGFR mit und ohne Dimerisierung



B) EGF-abhängige Internalisierung des EGFR mit und ohne Dimerisierung



C) Kontrolle

Abb. 49 Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Rezeptorinternalisierung. A) Zellen wurden vor der Dimerisierung und Stimulation entweder für 6 h gehungert (links) oder in EGF-haltigem Medium gehalten (rechts). Über einen Zeitraum von 13 min nach der Dimerisierung wurden die Markierung im Cy3-Kanal und die gesamte Population an modifiziertem EGFR im GFP-Kanal beobachtet. B) Nach der Dimerisierung an ungehungerten Zellen wurde eine Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an EGF für 5 min bei 37 °C in PBS-Puffer durchgeführt und die Zellen 13 min nach Entfernen des Liganden mikroskopiert. Unter den Aufnahmen für $t = 13$ min mit den Filtern für GFP, Cy3 und deren Überlagerung sind Vergrößerungen für die Zugabe von 1 und 10 nM EGF gezeigt. Die grauen Pfeile kennzeichnen Vesikel. C) Zellen wurden für 6 h gehungert, mit dem Farbstoff Hoechst33342 für 10 min in Puffer bei 37 °C angefärbt und anschließend für 2, 4 und 5 min in Puffer bei 25 °C gehalten mit dazwischenliegenden Waschschritten. Die Bildung von Bläschen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. DL – Durchlicht.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

auch eine Spezies mit geringerer Affinität von $K_D > 10$ nM auf der Zellmembran vorliegen kann. Die gezielte Bildung von Dimeren über die in dieser Arbeit etablierte PNA-DNA-Verbrückung kann genutzt werden, um die Rolle von (EGFR)₂-Dimeren in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an EGF zu untersuchen. Das Besondere dabei ist, dass die Dimerbildung temporal und lokal arretiert wird und abhängig von der artifiziellen PNA-DNA-Verbrückung ist und nicht primär von der Ligandkonzentration. Durch Beobachten des Internalisierungsverhaltens bei verschiedenen Konzentrationen an Ligand kann auf die Affinität der generierten Spezies geschlussfolgert werden. Zellen wurden nach dem PNA-Transfer entweder mit der DNA **47** „mono“ oder der Brücken-DNA **56** bzw. **57** behandelt und für 5 min bei 37 °C mit Konzentrationen von 0, 1, 10 und 20 nM EGF inkubiert. Die Internalisierung wurde in zeitlichen Abständen von 3, 8 und 13 min nach Entfernen des Liganden in der Mikroskopie in den GFP- und Cy3-spezifischen Kanälen beobachtet und der jeweilige finale Zustand in Abb. 49B zusammengetragen. Wie bereits erwähnt, ist eine leichte Vesikelbildung bereits in Abwesenheit von Ligand bei dimerisierten, ungehungerten Zellen zu verzeichnen. Diese Tendenz verstärkt sich bei 1 nM EGF. Besonders bei Verwendung von Brücken-DNA **57** ist eine starke Internalisierung des Rezeptors zu verzeichnen, sichtbar durch die hohe Anzahl an Cy3-Vesikeln im Zellinneren. Im Gegensatz dazu weist die Markierung mit der monovalenten DNA in Anwesenheit von 1 nM EGF weiterhin eine starke Membranlokalisation ohne Bildung von Endosomen auf. Bei Zugabe von 10 nM EGF ist dieser Unterschied zwischen monovalent und dimerisiert nicht mehr so deutlich, da die Internalisierung bereits auch im monovalenten Fall durch Vesikelbildung erkennbar ist und ein quantitativer Unterschied nicht deutlich gemacht werden kann. In beiden Fällen ist nach 13 min die Membranmarkierung geschwächt. Bei Zugabe von 20 nM EGF ist kaum noch membranständige Cy3-Markierung erkennbar, da die Internalisierung vollständig abgeschlossen ist. Dies wird durch Betrachtung des Signals im GFP-Kanal bestätigt, wo nur noch einige letzte EGFR-haltige Vesikel prozessiert werden und kein membranständiger Rezeptor mehr vorhanden ist. Dies zeigt, dass die Ligand-abhängige Aktivierung auch im Fall der induzierten Dimerisierung zur Degradation des Rezeptors führt und die Methode somit nicht den nativen Ablauf der Rezeptorverarbeitung abändert. Auch wird dadurch erkennbar, dass die DNA-Markierung stabil genug ist, um über Endozytose in das Zellinnere transportiert zu werden. In dem Moment, in welchem der Rezeptor abgebaut wird, ist der Cy3-markierte DNA-Strang nicht mehr in einem Kompartiment lokalisiert und das Signal „erlischt“ durch Verdünnung.

Diskussion

Die gezeigten Studien über Fluoreszenzmikroskopie machen deutlich, dass der PNA-tag zur simultanen Markierung und Modulation eines Rezeptors genutzt werden kann. Die vorhergehenden Beobachtungen aus Western Blot und Immunofluoreszenz, die ein Absinken

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

des Gesamt-EGFR-Signals aufwiesen, konnten eindeutig dem Prozess der Rezeptor-internalisierung und -degradation zugeordnet werden. Wesentlich ist dabei, dass die PNA-DNA-Verbrückung den natürlichen Ablauf der Rezeptorverarbeitung nicht abzuändern scheint. Die Rolle der Dimerisierung und des Liganden EGF wurde untersucht. Gehungerte, EGF-freie Zellen zeigen selbst mit induzierter Dimerisierung keine Internalisierung. Hohe EGF-Konzentrationen von 10 – 20 nM EGF hingegen führen zu einer schnellen EGFR-Internalisierung über Endosomen. In ungehungerten und geringfügig EGF-stimulierten Zellen mit bis zu 1 nM EGF-Konzentration zeigte sich ein Unterschied im Internalisierungsverhalten, wenn Rezeptoren zuvor dimerisiert wurden. Letztere wiesen eine erhöhte Vesikelbildung auf, während monovalent markierte Rezeptoren allein ein membranständiges Cy3-Signal zeigten. Die vorgeformten EGFR-Dimere scheinen somit bevorzugt eine Bindung mit EGF einzugehen und gehören somit zu der hochaffinen Spezies, nicht zur geringaffinen. Eine tiefergehende Diskussion in Zusammenhang mit den vorhergehenden Resultaten aus Western Blot und Immunofluoreszenz-Assay sowie mit literaturbeschriebenen Modellen wird im folgenden Abschnitt gegeben.

4.3.3) Diskussion zur EGFR-Dimerisierung

Es konnte durch drei verschiedene Untersuchungsmethoden demonstriert werden, dass eine Dimerbildung durch PNA-DNA-Verbrückung möglich ist. Dies zeichnet sich in den reproduzierbaren Effekten einer gesteigerten Phosphorylierung und verstärkten Internalisierung aus. Zugleich bietet die vorgestellte Methode die Möglichkeit, eingangs gestellte offene Fragen über den Mechanismus der EGFR-Aktivierung zu beantworten.

Was bewirkt eine verlängerte Lebensdauer von $(EGFR)_2$ in Hinblick auf die Aktivierung? Ist eine Aufhebung der intrinsischen Autoinhibition möglich, wenn Lebensdauern von Dimeren artifiziell verlängert werden?

Erzeugte EGFR-Dimere haben keine autokatalytische Aktivität in Bezug auf die gegenseitige Phosphorylierung. Eine langanhaltende, räumliche Organisation der Rezeptoren ist demnach nicht ausreichend, um die konformationelle Autoinhibition zu umgehen. Dies lässt sich sowohl aus der Analyse im Western Blot als auch in der Mikroskopie bestätigen. Wurde die Dimerisierung an gehungerten Zellen in Abwesenheit von Ligand durchgeführt war weder eine gesteigerte Phosphorylierung noch eine Internalisierung zu beobachten.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

Wie hängt der Anteil an EGFR-Dimeren auf der Zellmembran mit der Phosphorylierung durch EGF zusammen? Die Dimerisierung scheint ein der Phosphorylierung vorgelagerter Prozess zu sein, doch führt mehr (EGFR)₂ zwangsläufig zu einer höheren Population an pEGFR?

Ein erhöhter Anteil an dimerisierten Rezeptoren zeigte unter EGF-Gabe ebenso eine gesteigerte Phosphorylierung in Western Blot und Immunofluoreszenz-Assay, als auch eine beschleunigte Internalisierung in allen drei Untersuchungsarten. Diese Ergebnisse können nun in einen Zusammenhang mit Studien von Matsuzaki *et al.* gebracht werden, in denen eine basale Dimerbildung von 10% der EGF-Rezeptoren in Abwesenheit von EGF verzeichnet wurde. Die Dimerisierung und Phosphorylierung wurden unabhängig voneinander in Abhängigkeit der EGF-Konzentration untersucht (Abb. 50). Für die Dimerisierung wurde ein Halbmaximum von 30% Dimerpopulation bei ca. 1 nM EGF registriert. Der maximale Anteil an dimerisierten Rezeptoren lag demnach bei ca. 60%. Betrachtet man nun die quantitative Erhöhung der relativen Phosphorylierung in den Immunofluoreszenz-Studien so betrug der Faktor, um den sich die Phosphorylierung erhöhte ca. 1.8. Das heißt, dass der Anteil an phosphoryliertem EGFR von ursprünglich x% bei 20 nM EGF durch vorhergehende Dimerisierung auf $1.8 \cdot x\%$ erhöht wurde. Da bei 20 nM EGF die Phosphorylierung knapp über dem Halbmaximum liegt, bedeutet dies, dass durch vorhergehende Dimerisierung mit dieser Steigerung die maximale Phosphorylierung, wie sie im nativen System erzielbar ist, erreicht wurde. Der Anteil an dimerisierten Rezeptoren hat direkten Einfluss auf die Rezeptoraktivierung. Für biologisch relevante Systeme kann also geschlussfolgert werden, dass die Überexpression an EGFR auf krebsassoziierten Zellen eine gesteigerte Aktivität und damit ein erhöhtes Zellwachstum bewirken kann, indem der Anteil an EGFR-Dimeren konzentrationsbedingt gesteigert ist. Krebszellen wären somit „voraktiviert“ für eine Ligand-abhängige Stimulation.

Was bedeutet die räumliche und temporale Fixierung von (EGFR)₂ für die Ligandenaffinität? Ist diese Spezies hoch-affin gegenüber EGF ($K_D < 1$ nM) und zeichnet somit das Bild einer positiven Kooperativität, oder erfolgt eine Aktivierung erst bei hohen EGF-Konzentrationen ($K_D > 10$ nM) und unterstützt somit das Bild eines gehemmten zweiten Bindungsschritts und einer negativen Kooperativität? Welche Rolle spielen demnach Dimere bei physiologischen Konzentrationen von 4 nM EGF?

In den Untersuchungen zur Internalisierung des Rezeptors über Fluoreszenzmikroskopie wurde deutlich, dass bei vorhergehender Dimerisierung des Rezeptors eine Internalisierung bereits bei Konzentrationen von ≤ 1 nM EGF einsetzt. Dieser Effekt tritt nicht ein, wenn Rezeptoren monovalent markiert werden. Damit wird durch die Vororganisation eine Spezies gebildet, die hoch-affin für den Liganden ist. Die Dimerisierung führt also zur Affinitätssteigerung und ist

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

somit tendenziell Teil eines positiven Kooperativitätseffekts. Unter physiologischen Bedingungen bedeutet dies, dass Zellen mit einem erhöhten Dimeranteil (EGFR)₂ aktiver in Bezug auf ihre Autophosphorylierung sind, als Zellen, die diese „Voraktivierung“ nicht haben.

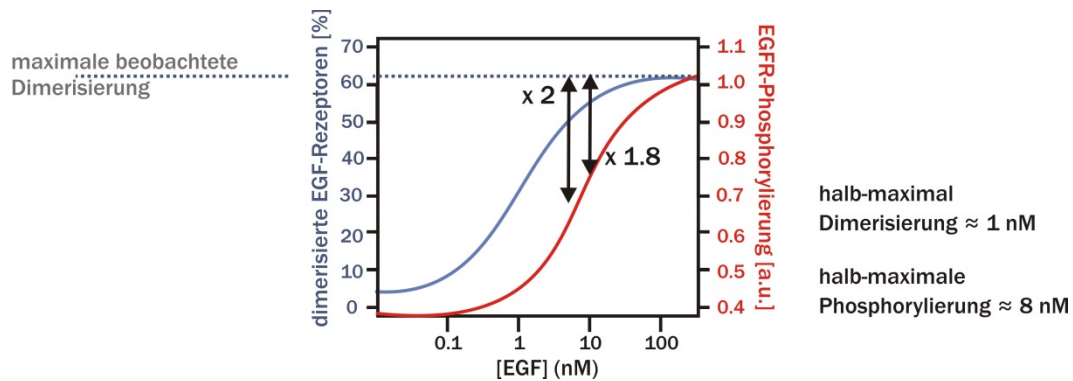


Abb. 50 Zusammenhang aus Dimerisierung (blau) und Phosphorylierung (rot) des EGFR. Der beobachtete Phosphorylierungsanstieg um Faktor 1.8 entspricht in etwa dem Erreichen des Maximums an phosphorylierter Spezies. Grafik adaptiert in Anlehnung an Matsuzaki *et al.*^[121]

4.3.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.3)

In diesem Kapitel wurde die Anwendung des PNA-Transfers über die Markierung hinaus demonstriert. Durch Zugabe einer verbrückenden DNA wurden zwei einzelne PNA-markierte EGF-Rezeptoren gezielt in räumliche Nähe gebracht. Der Einfluss der erzeugten Struktur auf die Rezeptoraktivität wurde untersucht, indem die Phosphorylierung über Western Blot und Immunofluoreszenz-Assay ausgelesen wurde und die Internalisierung des Rezeptors sowie der Cy3-markierten DNA über Fluoreszenzmikroskopie verfolgt wurde. Alle drei Untersuchungsmethoden zeichneten ein in sich konsistentes Bild, in welchem die der Stimulation durch EGF vorhergehende Verbrückung zweier Rezeptoren den Anteil an phosphorylierter Spezies pEGFR verdoppelte und zeitgleich zu einer Absenkung der Gesamt-EGFR-Menge führte. Letzteres konnte deutlich der Rezeptorinternalisierung und -degradation als Folge der Aktivierung zugeschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des EGFR dennoch einer Liganden-Stimulation bedarf. Zwar ist die induzierte Dimerisierung nicht ausreichend, um die intrinsische Autoinhibition des Rezeptors aufzuheben, doch konnte beobachtet werden, dass die Affinität des gebildeten Dimers gegenüber dem Liganden erhöht ist, im Vergleich zum nicht vororganisierten Rezeptor. Der PNA-Transfer konnte somit gezielt genutzt werden, um durch die kontrollierte Erzeugung definierter Strukturen im nativen zellulären Umfeld des zu untersuchenden Proteins, molekulare Wirkungsmechanismen aufzuklären.

4.3) Kontrollierte Rezeptordimerisierung des EGFR durch PNA-Transfer

SEKTION II

-

COILED-COIL-BASIERTE SYSTEME

Während Coil-Coil-Peptide in dieser Arbeit bislang allein als Vehikel zum Transfer von PNA-Sequenzen verwendet wurden, sollen sie in den folgenden Kapiteln in den Fokus rücken.

Im ersten Abschnitt 4.4 wird die Anwendung der Peptidpaare zur Reaktionskontrolle um die Möglichkeit der parallelen Durchführung ergänzt. Zwei zu einander orthogonale Peptid-Systeme P1 und P2 werden auf ihre Anwendbarkeit für den Fluorophortransfer untersucht (4.4.1 – 4.4.4). Diese Anwendung wird dann an zwei membranständigen Rezeptoren des Endothelinsystems getestet (4.4.5).

Der zweite Abschnitt 4.5 befasst sich mit der Dynamik in Coiled-Coil-Systemen. In Anlehnung an die Strangverdrängung in DNA-basierten Schaltern wird ein ähnliches Modell an Coiled-Coil-Peptiden etabliert. Ein peptidischer Überhang wird platziert und ermöglicht es, die Bindung eines Peptidpaares „EIN“- und „AUS“-zuschalten, indem ein komplementäres Verdrängungspeptid hinzugegeben wird (4.5.1 – 4.5.3). In einer praktischen Anwendung an der Syk-Kinase wird demonstriert, dass ein derartiges System genutzt werden kann, um zwischen mono- und bivalenten Bindungsmodi zu schalten und damit die Affinität von Peptid-Liganden gegenüber einem Protein zu kontrollieren (4.5.4).

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

4.4.1) Konzept

Die Übertragung von Markierungseinheiten wie PNA-Oligomeren und Fluorophoren über Coiled-Coil-Peptide hat sich als wertvolle Methode erwiesen.^[77] Gerade in Hinblick auf PNA wäre es vorteilhaft, nicht nur eine Sequenz, sondern mehrere verschiedene auf unterschiedliche Proteine übertragen zu können. Damit könnten zeitgleich verschiedene Rezeptoren visualisiert und auch in ihrer Funktion manipuliert werden, etwa durch erzwungene Proximität oder Distanz. Auch der parallele Transfer mehrerer Fluorophore auf verschiedene Proteine ist wünschenswert, da hiermit kleine, wenig invasive Markereinheiten installiert werden, die das Zusammenspiel der Proteine sichtbar machen. Um verschiedene Einheiten, ob Farbstoffe oder Oligonuklotide, parallel und selektiv auf verschiedene Rezeptoren zu übertragen, bedarf es allerdings eines Repertoires an Coiled-Coil-Paaren, die spezifisch miteinander Wechselwirkungen eingehen. Wie in Abb. 51 dargestellt, erfordert der Transfer zweier Fluorophore auch zwei Coiled-Coil-Paare: in Coiled-Coil-Paar I erfolgt die spezifische Interaktion von Donor I (blau) mit Akzeptor I (grün) ohne, dass Kreuzinteraktionen mit dem anderen Peptidpaar (rot und orange) stattfinden. Analog haben Donor II (orange) und Akzeptor II (rot) eine Bindungselektivität zu einander, ohne mit dem Coiled-Coil-Paar I zu wechselwirken. Viele Rezeptorklassen weisen die Heterodimerisierung zweier verwandter Rezeptoren als Teil einer Signalkaskade auf, so etwa EGFR (ErbB1) und HER2 (ErbB2) aus der Familie der EGFRs oder ET_AR und ET_BR aus der Super-Familie der GPCRs. Letztere sind wesentliche Akteure des Endothelin-Systems. Um bessere Kenntnis vom Zusammenspiel dieser Rezeptoren zu erlangen, wäre eine Visualisierung über orthogonale Coiled-Coil-Peptide von Vorteil.

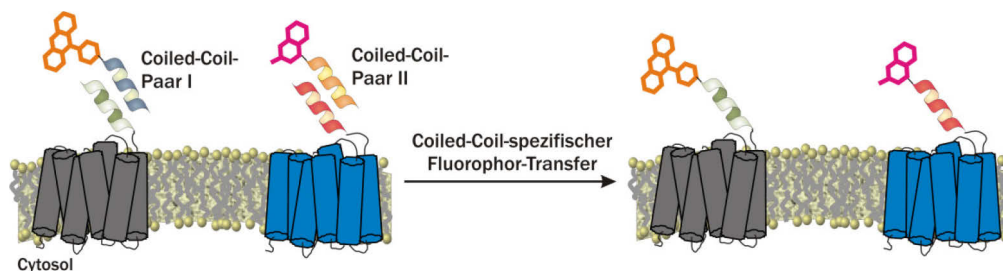


Abb. 51 Konzept des parallelen Coiled-Coil-spezifischen Transfers zweier Fluorophore auf zwei verschiedene GPCRs. Fluorophore sind schematisch als Xanthen- oder Coumarin-basierte Körper gezeigt.

In der Literatur sind bereits Beispiele für orthogonale Coiled-Coil-Peptide, wie sie hier erforderlich sind, bekannt.^[22, 103] Diese helikalen Peptidpaare, weisen über elektrostatische und hydrophobe Interaktionen eine spezifische Affinität für einander auf, interagieren jedoch nicht bzw. nur geringfügig mit anderen Coiled-Coil-Peptiden. Die Orthogonalität wird dabei durch

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Wahl der Aminosäuren vermittelt (ausführliche Darstellung in Kapitel 2.2) und ist sowohl in der Natur anzutreffen als auch im *de novo*-Design gestaltbar. Die durch *de novo*-Berechnung erzeugten Peptide werden im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt, da ihnen eine geringe Tendenz zur unspezifischen Wechselwirkung mit natürlichen Proteinen in der zellulären Umgebung eingeräumt wird.^[104] Bevor die Klonierung entsprechender Rezeptormutanten vorgenommen werden sollte, wurde das Konzept des orthogonalen Coiled-Coil-vermittelten Fluorophor-transfers außerhalb der Zelle untersucht, optimiert und evaluiert. Entsprechende Thioester-basierte Fluorophor-Donoren sollten hergestellt, auf ihre Transfereffizienz und in besonderem Maße auf ihre Selektivität untersucht werden. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums durch Marc Reimann unterstützt.

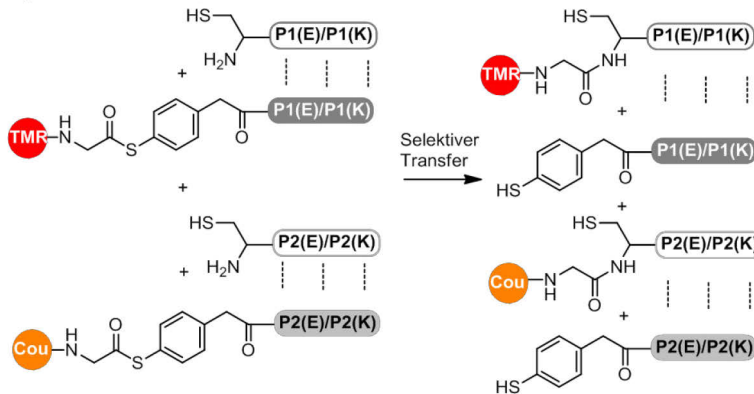
4.4.2) Sequenzen und Synthese

Das beschriebene Konzept sollte anhand zweier literaturbekannter, orthogonaler Peptidpaare wie sie von Gradišar und Jerala vorgestellt wurden, getestet werden.^[104] Die Gruppe um Jerala *et al.* nutzte rationales Design und die Vorkenntnis über stabilisierende und destabilisierende Wechselwirkungen in helikalen Peptidpaaren, um ein Repertoire orthogonaler Peptide mit paralleler Orientierung und einer Länge von vier Heptaden zu erzeugen. Daraus ergaben sich unter anderem die zwei in Abb. 52C gezeigten Peptidpaare I und II mit bemerkenswerten Stabilitäten. Während Peptidpaar II im thermischen Denaturierungsexperiment eine Schmelztemperatur von ca. 65 °C aufwies, war Peptidpaar I selbst bei 90 °C noch nicht vollständig denaturiert und zeigte noch eine in großen Teilen helikale Struktur. Als Indikator für die Helizität wurde die molare Elliptizität bei 222 nm genutzt. Auch gegenüber chaotropen Agenzien wie Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff zeigten diese beiden Peptidpaare eine hohe Stabilität. Vor allem konnte die Orthogonalität der Peptidpaare über Circular dichroismus gezeigt werden. Somit erfüllten die gewählten Peptidpaare I und II die Bedingungen i) Stabilität, ii) parallele Orientierung und iii) Selektivität / Orthogonalität. In Anbetracht der hohen Stabilität von Peptidpaar I und den positiven Erfahrungen, die bislang mit dem 3-Heptanden-langen Peptidpaar E3/K3 gemacht wurden, wurde ein verkürztes Peptidpaar I* in Betracht gezogen. Dabei wurde das Paar I um eine Heptade N-terminal verkürzt. Basierend auf dem repetitiven Auftreten von Lysin (K) zur Erzeugung einer positiven Gesamtladung oder Glutaminsäure (E) für eine negative Ladung wurden die Peptidpaare in die Peptide **P1(E)/P1(K)**, **P2(E)/P2(K)** sowie **P1*(E)/P1*(K)** unterteilt.

Der Fluorophortransfer sollte auf Grundlage des reaktiven MPAA-Thioesters erfolgen und zunächst an den reinen Peptidpaaren ohne konjugiertes Protein über HPLC verfolgt werden

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

A) Paralleler Fluorophortransfer



B) Hergestellte Donoren / Akzeptoren

| Peptid | Cys-X | TMR-MPAA-X | Cou-MPAA-X |
|--------|-------|------------|------------|
| P1*(E) | 62 | 63 | - |
| P1*(K) | 64 | 65 | - |
| P1(E) | 66 | 67 | - |
| P1(K) | 68 | 69 | - |
| P2(E) | 70 | - | 71 |
| P2(K) | 72 | - | 73 |

C) Orthogonale Peptidpaare I, II und I*

Coiled-Coil-Paar I

P1(E) EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY
P1(K) KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY

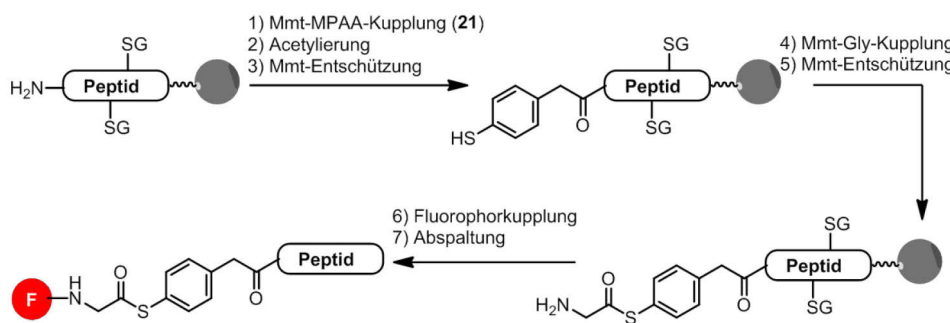
Coiled-Coil-Paar II

P2(E) EIQQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY
P2(K) KIAQLKQ KIQALKQ ENQQLEE ENAALEY

Coiled-Coil-Paar I*

P1*(E) ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY
P1*(K) KNAALKE KNQQLKE KIQALKY

D) Synthese MPAA-basierter Fluorophor-Donoren



E) Strukturen TMR & Cou

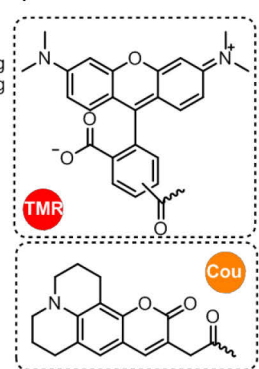


Abb. 52 Konzept des parallelen Fluorophortransfers über orthogonale Coiled-Coil-Peptide. A) Reaktionsschema des parallelen Transfers: auf Grundlage des MPAA-Thioesters wird der Fluorophor TMR innerhalb des P1-Systems und Cou innerhalb des P2-Systems übertragen. B) Hergestellte Peptide zur Untersuchung des orthogonalen Fluorophortransfers. Jedes Peptid wurde als Akzeptor (Cys-X) und als Donor hergestellt. Für das P1*- und P1-System sollte TMR und für das P2-System Cou übertragen werden. C) Sequenzen der einzelnen orthogonalen Peptidpaare I, II und I*. D) Synthese der Fluorophordonoren mit MPAA-Thioester: 1) 4 Äq. Mmt-MPAA, 4 Äq. Oxyma, 3.6 Äq. HCTU, 8 Äq. NMM in DMF; 2) Essigsäureanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89); 3) 2% TFA, 2% TIS in DCM; 4) 4 Äq. Mmt-Gly, 4 Äq. Oxyma, 3.6 Äq. HCTU, 8 Äq. NMM in DMF; 5) 2% TFA, 2% TIS in DCM; 6) 4 Äq. TMR bzw. Cou, 4 Äq. Oxyma, 3.6 Äq. HCTU, 8 Äq. NMM in DMF; 7) 2% TIS, 2% H₂O in TFA.

(Abb. 52A). Die Synthese entsprechender Donor-Peptide erfolgte nach bekanntem Schema (Abb. 52D).^[77] Als Akzeptorpeptide sollten die komplementären Coiled-Coil-Peptide mit einem N-terminalen Cystein versehen werden. Es bestand nun die Möglichkeit zu wählen, ob jeweils das positive K-Peptid bzw. das negativ geladene E-Peptid als Donor bzw. Akzeptor eingesetzt werden sollte. Da auf keine validen Vorkenntnisse zurückgegriffen werden konnte, wurden jeweils beide Varianten untersucht. Hierfür wurde eine Reihe von Donor- und Akzeptorpeptiden hergestellt, wie sie in der Tabelle in Abb. 52B zusammengefasst ist. In jedem Paar konnte der Transfer vom K- auf das E-Peptid und umgekehrt untersucht werden. Als zu übertragende

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Fluorophore wurden TMR und Coumarin343 (Cou) gewählt (Abb. 52E). Ihre Anregungs- und Emissionsspektren sind verschieden genug, um ein paralleles Auslesen in der Rezeptormarkierung zu ermöglichen. Zudem sind beide Farbstoffe auch unter sauren Bedingungen, wie in der HPLC-Analyse, fluoreszent, was die wellenlängenspezifische Detektion (FL-D) ermöglicht.

4.4.3) Einfacher Fluorophortransfer über orthogonale Coiled-Coil-Peptide

Die Transferexperimente wurden analog den Experimenten in Kapitel 4.1 in entgastem Phosphatpuffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) in Anwesenheit von 1 mM TCEP durchgeführt. Die Peptidkonzentrationen wurden wie in vorhergehenden Experimenten zum Fluorophortransfer auf 0.5 µM eingestellt und die Detektion bei den fluorophorspezifischen Wellenlängen von $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$ für TMR bzw. $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$ für Cou durchgeführt. Das Cysteiny-Peptid wurde jeweils in entgastem Puffer mit TCEP vorgelegt, 10 min inkubiert und durch Zugabe eines Äquivalents an Thioester der Transfer gestartet. In einem Zeitraum von 10 min wurden jeweils Aliquote entnommen, mit 2 vol% TFA die Reaktion unterdrückt und die Analyse über HPLC-FL-D vorgenommen. Für die korrekte Zuordnung der entstehenden Produkte wurden ergänzende Experimente durch UPLCTM-MS oder MALDI-TOF-Analytik der gesammelten Fraktionen hinzugezogen. Die Quantifikation der einzelnen entstehenden Komponenten erfolgte durch Integration der Signale.

Transfer am verkürztem P1(E) -P1*(K) -System*

Wie die Chromatogramme der reinen TMR-Donor-Verbindungen **TMR-P1*(E) 63**, **TMR-P1*(K) 65** sowie **TMR-P1(E) 67** und **TMR-P1(K) 69** zeigen, treten die beiden 5,6-Isomere des Farbstoffs TMR als doppeltes Signal auf. Dies trifft auf alle TMR-Donor-Peptide zu, allerdings variiert der Anteil beider Isomere in Abhängigkeit von der Aufreinigung (Abb. 53A, obere und mittlere Reihe).

Zunächst wurde der Transfer vom Donor **TMR-P1*(K) 65** untersucht (Abb. 53B, links). Bei Detektion in TMR-spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen zeigte das Chromatogramm nach 10 min das Auftreten mehrerer neuer Signale, die durch i) den Vergleich mit der Retentionszeit des Edukts, ii) den Vergleich mit dem Chromatogramm ohne Zugabe von Akzeptorpeptid (Abb. 53B, links oben) und iii) einer Analyse durch UPLCTM-MS und MALDI-TOF-MS zugeordnet wurden. Die Signale bei 13.2 min und 13.8 min sind das Ergebnis der Hydrolyse des Thioesters und entsprechen den beiden Isomeren von TMR-Glycin-COOH **F** (Abb. 53C).

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Dieses Nebenprodukt bildete mit 75% den größten Teil der Verbindungen. Ein geringer Teil war das doppelte Transferprodukt **DTP**, welches gebildet wird, wenn nach der Entstehung des Produkts ein weiterer Fluorophor übertragen wird. Dieses **DTP** enthält wiederum einen Thioester, der zu Produkt **P** und dem Fluorophor-Glycin **F** hydrolysieren kann.

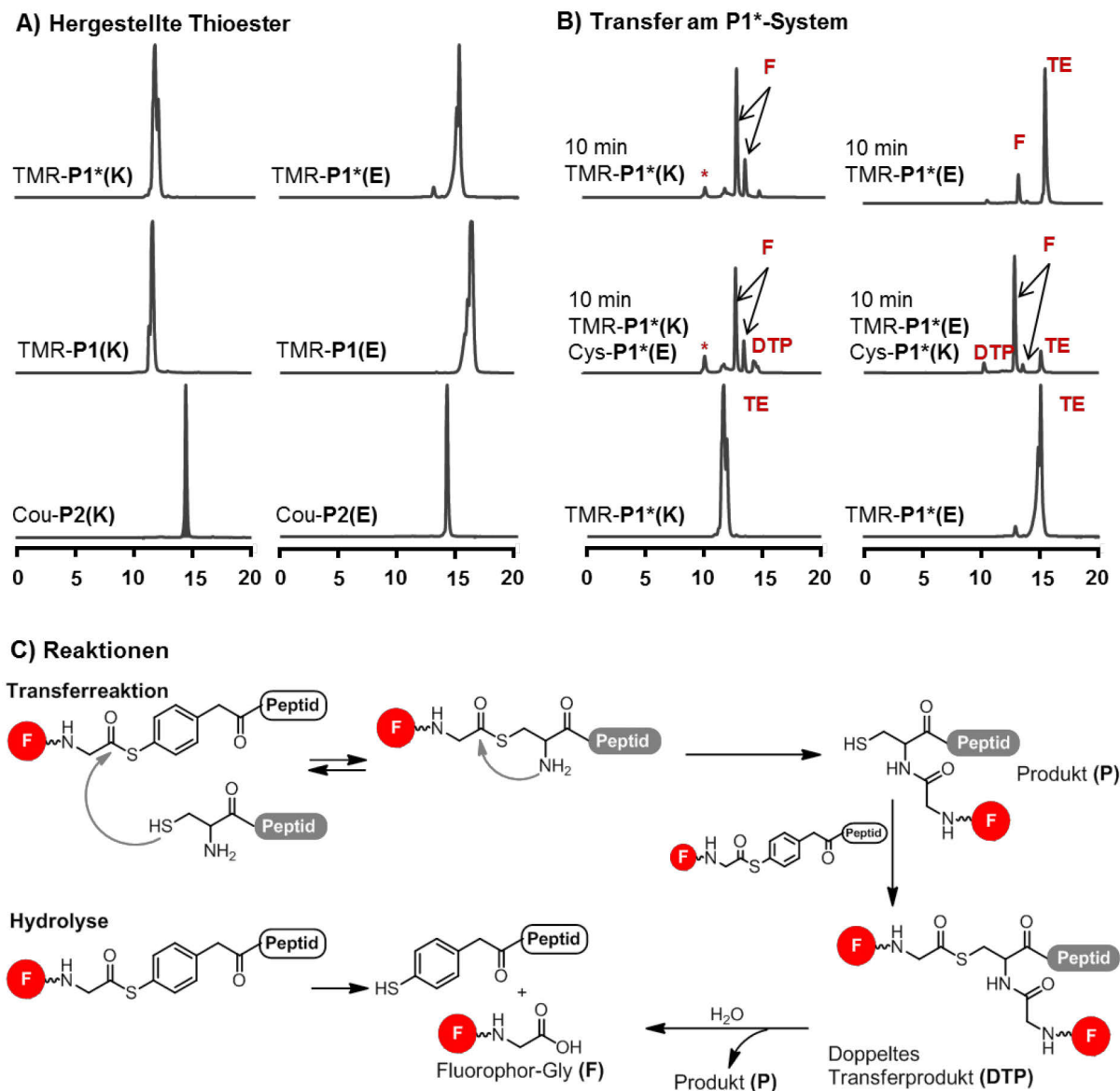


Abb. 53 Chromatogramme und Reaktionen zum Fluorophortransfer an orthogonalen Coiled-Coil-Peptiden. A) Hergestellte TMR- (oben, Mitte) und Cou-Donoren (unten) basierend auf Lysin- (links) und Glutaminsäure-reichen (rechts) Peptiden. B) Chromatogramme zu Transferexperimenten am P1*-System: **TMR-P1*(K)**-Donor (links) und **TMR-P1*(E)**-Donor (rechts). Ausgehend von den Retentionszeiten der reinen Donor-Peptide (unten) erfolgte die Zuordnung der Signale nach 10 min Transferreaktion (Mitte) bzw. 10 min Hintergrundreaktion ohne Akzeptorpeptid (oben). Die mit (*) gekennzeichnete Verbindung konnte nicht identifiziert werden, stellt aber auf Grund ihres Auftretens in der Kontrollreaktion (oben) nicht das Produkt dar. Gradient 20 – 80% Laufmittel B in 20 min, $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$. C) Reaktionen, die zu den fluoreszenten, beobachtbaren Produkten **P**, **DTP** und **F** führen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch der Transfer durch das Donor-Peptid **TMR-P1*(E) 63** auf das Akzeptor-Peptid **Cys-P1*(K) 64**. Da in beiden Reaktionen nur geringe Ausbeuten an **P** oder **DTP** detektiert wurden, im Gegensatz dazu jedoch die Hydrolyse dominant war, wurde die Untersuchung der gekürzten drei-Heptanden-langen Peptide verworfen.

Transfer am **P1(E)-P1(K)**-System

Die Untersuchungen am Volllängensystem aus vier Heptaden wurden vor allen Dingen für den Transfer vom Donor **TMR-P1(K) 69** auf **Cys-P1(E) 66** vorgenommen. Für den umgekehrten Fall von Donor **TMR-P1(E) 67** und Akzeptor **Cys-P1(K) 68** konnte keine chromatographische Auswertung durchgeführt werden, da bereits der Donor eine schlechte Löslichkeit aufwies. Unter den für den Transfer gewählten Bedingungen kam es zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, die zu neuen Signalen in der HPLC- und UPLCTM-Analyse (vergl. Abb. 53A, **TMR-P1(E)**) führten. Bei Zugabe des Akzeptors **68** kam es zu Präzipitation.

Der Transfer vom Donor **TMR-P1(K)** auf **Cys-P1(E)** erwies sich hingegen als sehr erfolgreich. Bereits nach 15 s (Abb. 54A, links) bildete sich ein neues Signal aus **P** und **DTP**, welches sich im zeitlichen Verlauf (Abb. 54A, rechts) kaum änderte. Ein sehr geringfügiger Anteil an hydrolysiertem TMR-Glycin **F** konnte beobachtet werden. Um eine konkrete Zuordnung zu ermöglichen wurde das erwartete Produkt **P TMR-GC-P1(E)** hergestellt und die Retentionszeit verglichen (Abb. 54B, links). In der Tat stimmte die Retentionszeit von 15.3 min mit dem neu entstandenen Signal überein. Die Schulter in der Transferreaktion konnte zum Teil dem Isomerengemisch, zum Teil dem doppelten Transfer **DTP** zugeschrieben werden. Um das

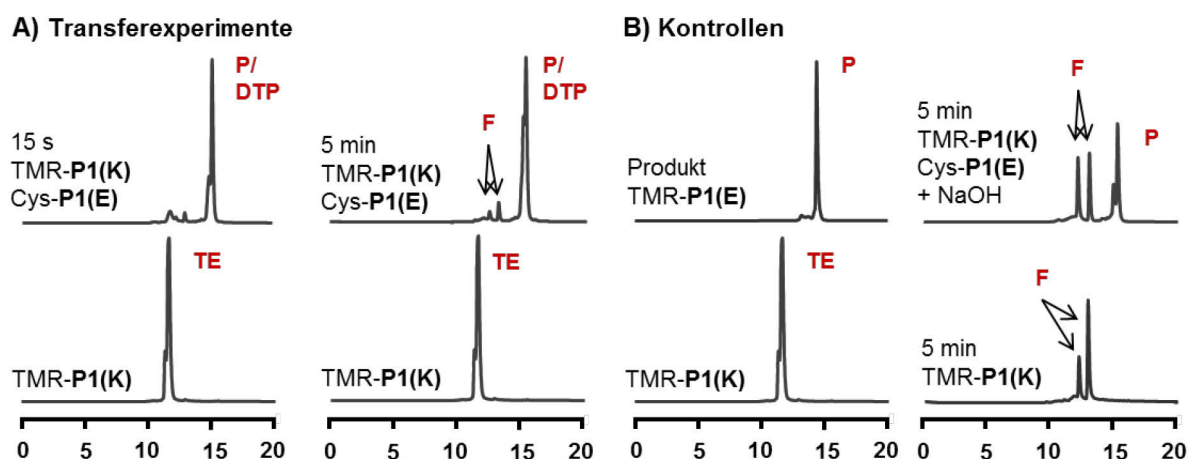


Abb. 54 Chromatogramme zum Transfer am **TMR-P1(K)**-Donor. A) Transferexperimente nach 15 s (links) und 5 min (rechts) im Vergleich zur Ausgangsverbindung (unten). B) Kontrollelexperimente: links: Verschiebung in der Retentionszeit zwischen Donor-Peptid (unten) und synthetisch hergestelltem Transferprodukt **TMR-GC-P1(E) 74** (oben); rechts: Hydrolyse von **DTP** nach 5 min Transfer durch Zugabe von NaOH (oben) und Hydrolyse des Donor-Peptides **TMR-P1(K)** nach 5 min in Puffer (unten). Chromatogramme bei 20 – 80% Laufmittel B mit $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$.

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Vorliegen von **DTP** nicht nur in der massenspektrometrischen Analyse zu verifizieren, wurde folgendes Kontrollexperiment durchgeführt: nach 5 min Transferreaktion vom Donor **TMR-P1(K)** auf **Cys-P1(E)** wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA beendet und anschließend die Reaktionsmischung mit 1 M NaOH-Lösung soweit versetzt, dass sich ein basischer pH-Wert einstellte. Nach weiteren 10 min wurde die Lösung wieder azidifiziert und in der HPLC-FL-D-Analyse untersucht. Durch die basische Behandlung wurde der Thioester des **DTP** verseift und führte zu einer Erhöhung der Signale der Isomere von **F** und das verbleibende Produkt **P** (Abb. 54B, rechts oben). Hiermit konnte gezeigt werden, dass neben dem Produkt **P** auch **DTP** als Ergebnis der Transferreaktion entsteht. Bei Abwesenheit des Akzeptorpeptids **66** ist nach 5 min in Puffer die vollständige Hydrolyse des Thioesters **69** zu beobachten (Abb. 54B, unten).

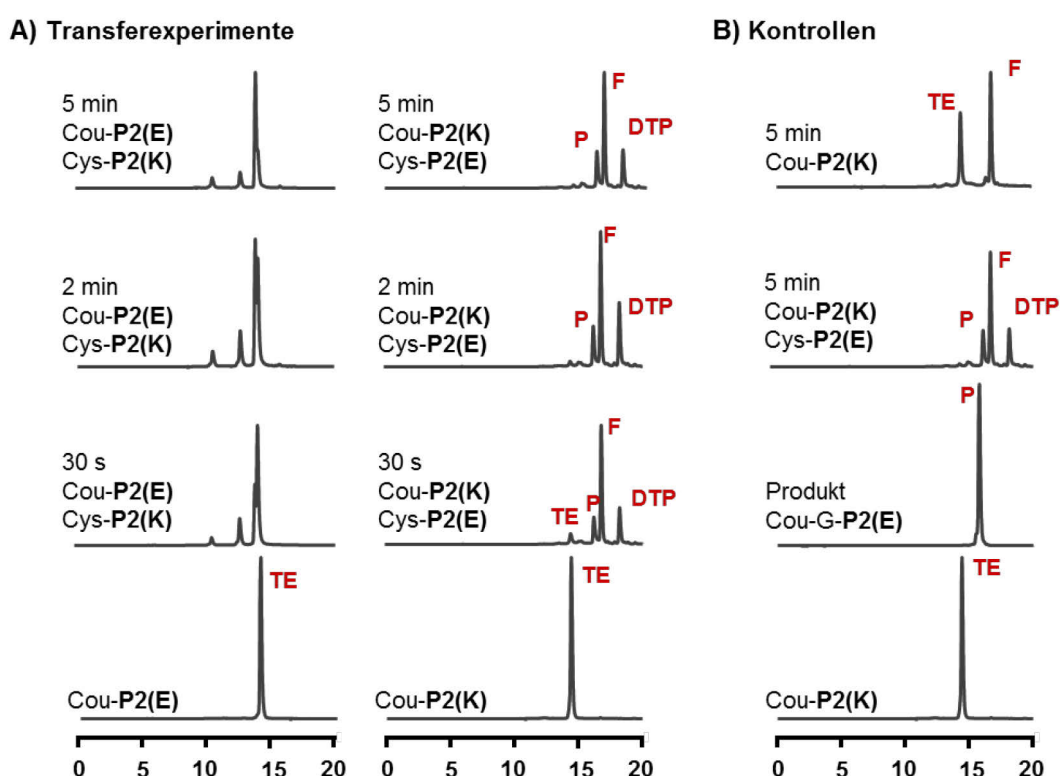


Abb. 55 Chromatogramme zum Transfer am P2-System: A) Zeitabhängiger Transfer von Coumarin343 durch Donor **Cou-P2(E)** **71** bei 30 – 80% Laufmittel B (links) und Donor **Cou-P2(K)** **73** bei 20 – 80% Laufmittel B (rechts). B) Kontrollexperimente zum Donor-System **Cou-P2(K)** **73**: Vergleich der Retentionszeiten des Donors (unten), des synthetisierten Produkts **Cou-GC-P2(E)** **75** (zweites von unten), Transferreaktion nach 5 min (zweites von oben) und Donors ohne Akzeptorpeptid nach 5 min in Puffer (oben). Gradient: 20 – 80% Laufmittel B mit $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$.

Transfer am P2(E)-P2(K)-System

Um ein zum P1-System orthogonales Paar zu bilden wurden die Donoren **71** und **73** mit dem Farbstoff Coumarin343 (Cou) versehen. Zunächst wurde der Transfer von Donor **Cou-P2(E)** **71** auf Akzeptor **Cys-P2(K)** **72** untersucht (Abb. 55A, links). Die Auswertung wurde dadurch erschwert, dass eins der neu entstehenden Signale nicht vom Edukt getrennt werden konnte.

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Der Fokus verlagerte sich daraufhin auf die Untersuchung des Systems aus Donor **Cou-P2(K) 73** und Akzeptor **Cys-P2(E) 70** (Abb. 55A rechts).

Der Transfer vom Donor **Cou-P2(K) 73** auf Akzeptor **Cys-P2(E) 70** führte zur Bildung der Produkte **P**, **DTP** und dem Hydrolyseprodukt **F** (Abb. 55A, rechts). Die Zuordnung der Signale wurde durch die Synthese des zu erwartenden Produkts **Cou-GC-P2(E) 75** mit einer Retentionszeit von 16.4 min (Abb. 55B, zweite Reihe von unten) und die Hydrolyse des Donors nach 5 min in Puffer unter Bildung von **F** bei 16.9 min (oben) bestätigt. Zwar waren nach 10 min Transferreaktion ca. 60% des Fluorophors in Form des Hydrolyseprodukts **F** zu finden, doch wurde die Bildung von Produkt **P** und **DTP** als ausreichend gewertet, um weitere Untersuchungen zur parallelen Anwendbarkeit der Transferreaktionen am System P1 und P2 durchzuführen. Ähnliche Ausbeuten von ca. 40 – 60% wurden auch für den Fluorophortransfer am K3/E3-System beobachtet.^[82]

4.4.4) Paralleler Fluorophortransfer über orthogonale Coiled-Coil-Peptide

Paralleler Transfer

Die orthogonale Anwendung der Transfersysteme P1 aus Donor **TMR-P1(K) 69** und **Cys-P1(E) 66** und P2 aus Donor **Cou-P2(K) 73** und Akzeptor **Cys-P2(E) 70** sollte untersucht werden, indem beide Reaktionen zeitgleich in einer Reaktionsmischung durchgeführt wurden und in zeitlichen Abständen Aliquote im TMR- bzw. Cou-spezifischen Wellenlängenbereich über HPLC analysiert wurden. Die Cysteiny-Peptide wurden in TCEP-haltigem, entgasten Puffer in je 0.5 µM Konzentration vorgelegt und mit je einem Äquivalent Thioester-Peptid versetzt. Ob die Thioesterzugabe sequentiell oder zeitgleich erfolgte, zeigte keinen Unterschied in den entstehenden Verbindungen. In Abb. 56 sind die Chromatogramme für den TMR-Kanal (Abb. 56A) und Cou-Kanal (Abb. 56B) gezeigt. Jeweils rechts sind vergleichsweise die Chromatogramme für das Transferexperiment in der nicht-parallelen Durchführung beigelegt. Bei kompletter Orthogonalität der Transferreaktionen, sollten die gleichen Signale im parallelen Transfer, wie in der einzelnen Experimentführung, also der separaten Durchführung der Transferreaktionen, beobachtbar sein. Für das P1-Peptidsystem ist das qualitativ sowie quantitativ zutreffend. Bereits nach 15 s wurde der Thioester vollständig verbraucht und in **P** und **DTP** umgesetzt. Dies wurde neben dem Abgleich der Retentionszeiten auch massenspektrometrisch verifiziert und sichergestellt, dass kein Transfer auf das P2-Akzeptorpeptid erfolgte. Auch im P2-Transfer waren keine qualitativen Veränderungen zu beobachten. Nach wie vor kam es zur Bildung von **P**, **DTP** und **F** mit den gleichen Retentionszeiten und keinen weiteren Signalen, die auf einen unspezifischen Transfer von Coumarin343 auf das P1-Peptid hinweisen

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

könnten. Allerdings kam es zu quantitativen Änderungen in den einzelnen Integralen. So wurde in der parallelen Experimentführung weniger Hydrolyse unter Bildung von **F** beobachtet (Abb. 56B, links) zugunsten einer höheren Signalintensität für Produkt **P**. Im zeitlichen Verlauf kann die Abnahme von **DTP** und proportionale Zunahme von **P** verzeichnet werden. In Abb. 56C wird dieser Zusammenhang quantitativ ausgewertet, indem die Flächenintegrale der einzelnen Verbindungen gegen die Zeit aufgetragen werden. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme einer gleichbleibenden Fluoreszenz der Farbstoffe TMR und Cou, da die möglichen Änderungen, die durch die Art der Verknüpfung in **TE**, **P**, **DTP** und **F** entstehen, für vernachlässigbar befunden

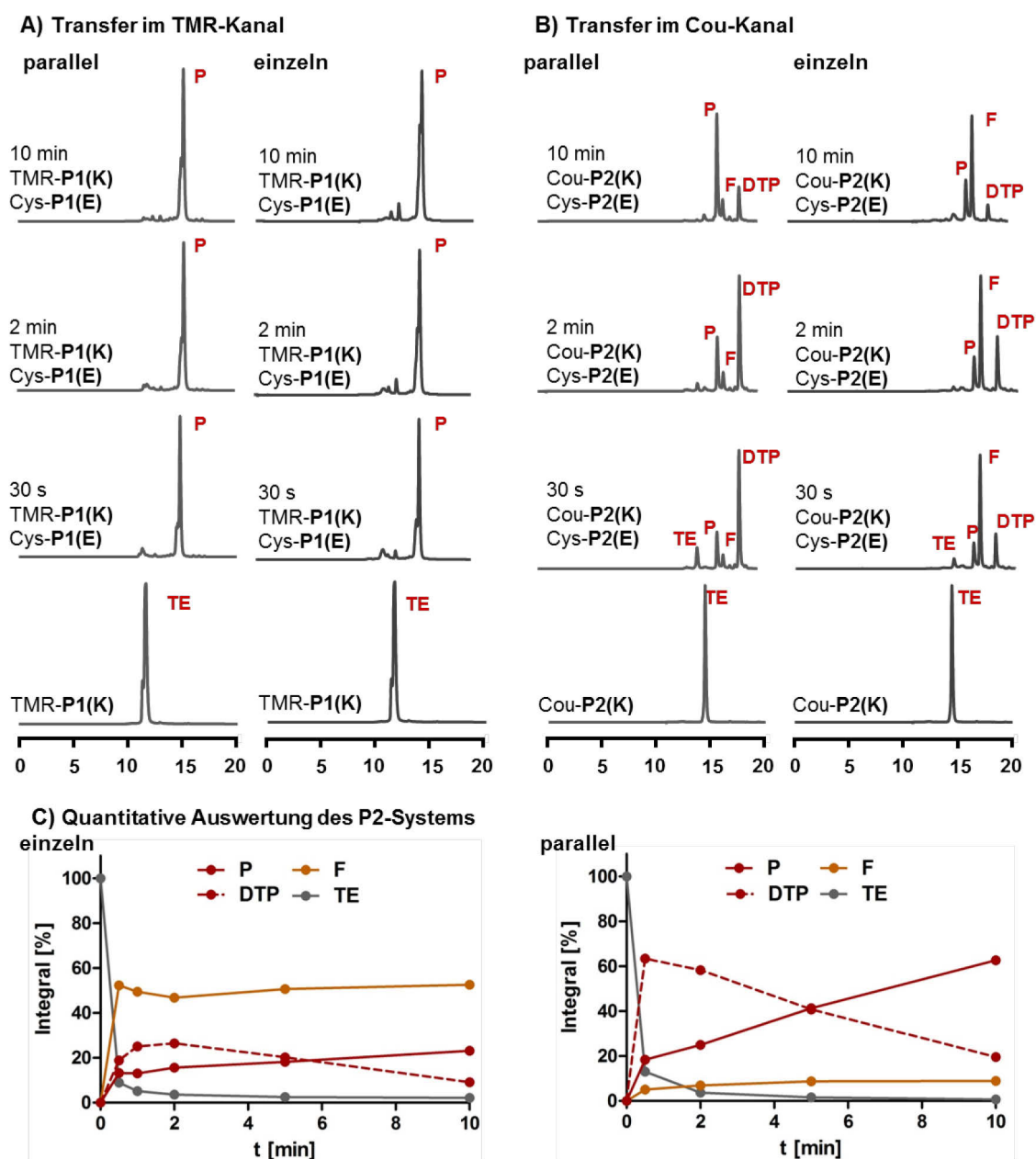


Abb. 56 Chromatogramme zum Vergleich des parallel (links) und einzeln (rechts) stattfindenden Reaktionsverlaufs in zeitlicher Abhängigkeit. A) Auswertung im TMR-Kanal bei $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$ und B) Auswertung im Cou-Kanal bei $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$. Gradient: 20 – 80% Laufmittel B. Paralleler Transfer mit je $0.5 \mu\text{M}$ **TMR-P1(K)**, **Cys-P1(E)**, **Cou-P2(K)** und **Cys-P1(E)**. C) Auswertung der Integrale im Cou-Kanal für das P2-System und Vergleich zwischen der einzelnen Transferreaktion (links) und der Durchführung parallel zu P1-System (rechts).

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

wurden. Die Summe aller fluorescent detektierten Verbindungen wurde dabei auf 100% normiert und keine Umrechnung anhand der Anzahl an Fluorophoren je Molekül vorgenommen. Wird nur die Transferreaktion von Donor **Cou-P2(K)** **73** auf Akzeptor **Cys-P2(E)** **70** durchgeführt, so dominiert die Hydrolyse des Thioesters (Abb. 56C links, orange Linie). Innerhalb der ersten 2 min bildet sich **DTP**, welches im Folgenden zu **P** und **F** hydrolysiert. Dies ist im parallelen Anstieg beider Linien zu erkennen (rot und orange). Wird die Reaktion nun parallel zum Transfer am P1-System durchgeführt, nimmt die Hydrolyse deutlich ab und führt zu einer geringeren Signalintensität für **F** (Abb. 56C rechts, orange Linie). Es kommt wiederum zu einer schnellen Bildung von **DTP** in den ersten Sekunden. Da die Abnahme von **DTP** proportional zur Zunahme an **P** ist, ist davon auszugehen, dass statt der Hydrolyse von **DTP** zu **F** und **P**, die Umsetzung von **DTP** zu zwei Äquivalenten **P** unter Verbrauch eines Äquivalents Akzeptorpeptids abläuft. Zusammenfassend heißt dies, dass eine parallele Versuchsdurchführung die Transferreaktionen beeinflussen kann. Eine gegenseitige Beeinflussung der Coiled-Coil-Peptide untereinander kann demnach stattfinden, allerdings ohne Bildung weiterer unerwünschter Nebenprodukte. Um die gezeigte Selektivität zu untermauern, wurden zusätzliche Kontrollexperimente zur Kreuzreaktivität durchgeführt.

Kontrollexperimente

Um sicherzustellen, dass der Donor **TMR-P1(K)** **69** allein mit dem Akzeptor **Cys-P1(E)** **66** und nicht mit **Cys-P2(E)** **70** interagiert und der Donor **Cou-P2(K)** **73** allein mit Akzeptor **Cys-P2(E)** **70** und nicht mit **Cys-P1(E)** **66** wechselwirkt, wurden Negativkontrollen mit Donor **TMR-P1(K)** **69** und **Cys-P2(E)** **70** bzw. Donor **Cou-P2(K)** **73** und **Cys-P1(E)** **66** vorgenommen (Abb. 57). Ist Orthogonalität gegeben, ist allein die Bildung von Hydrolyseprodukt **F** erwartbar. Dies konnte für beide Donoren gezeigt werden (Abb. 57A und B). Auch in der Analyse über MALDI-TOF-MS konnte kein unspezifisches Transferprodukt gefunden werden.

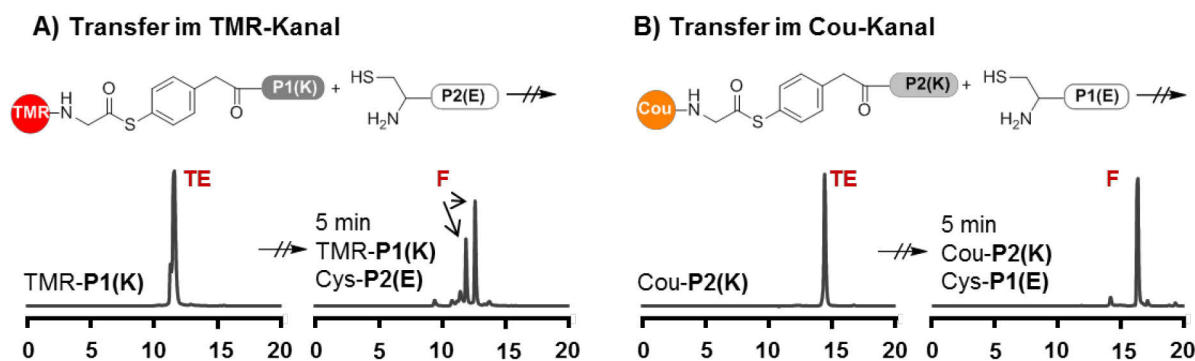


Abb. 57 Chromatogramme zu Kontrollexperimenten. A) Je 0.5 μM Donor **TMR-P1(K)** **69** und **Cys-P2(E)** **70** zu Reaktionsbeginn (links) und nach 5 min (rechts) bei $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$. B) Je 0.5 μM Donor **Cou-P2(K)** **73** und **Cys-P1(E)** **66** zu Reaktionsbeginn (links) und nach 5 min (rechts) bei $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$. Gradient: 20 – 80% Laufmittel B.

4.4.5) Paralleler Fluorophortransfer an GPCRs

Das Endothelin-System

Die Möglichkeit, die Fluorophore Coumarin343 und TMR parallel über zwei orthogonale Transfersysteme auf zwei verschiedene Akzeptoren zu übertragen, sollte im Folgenden genutzt werden, um die Rezeptoren ET_AR und ET_BR kovalent an der Zelloberfläche zu markieren. Diese zwei GPCRs gehören zum Endothelinsystem, welches essentiell für die Regulation der Vasokontraktion und -dilatation und somit den Blutdruck ist.^[293, 294] Es spielt damit eine entscheidende Rolle in Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die gezielte Blockierung von ET-Rezeptoren kann von therapeutischem Nutzen sein.^[295, 296] Endothelinrezeptoren befinden sich auf der Oberfläche von Endothelzellen und können durch Endotheline (ET) - 21-Aminosäure-lange Peptide - stimuliert werden.^[297] Die Endotheline ET-1 und ET-2 binden dabei sowohl ET_AR als auch ET_BR, wohingegen ET-3 eine schwache Affinität allein für ET_AR aufweist. Bereits in anderen Unterfamilien der GPCRs ist Homo- (z.B. GABA Rezeptoren) und Heterodimerisierung (z.B. Angiotensin AT₁ und Bradykinin B₂) bekannt.^[293] Die gegenseitige Abhängigkeit in der Aktivierung in bestimmten Zelltypen, die Copräzipitation in transfizierten Zellen und weitere Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch ET_AR und ET_BR über Heterodimerisierung in ihrer Aktivität und der Weiterleitung bestimmt werden.^[293, 295, 297] Zwar wurden ET_AR und ET_BR bereits mit fluoreszenten Fusionsproteinen untersucht, allerdings können diese die native Funktion stark stören.^[298] Zudem sind sie permanent und können nicht gezielt erst ab Erreichen der Membran aktiviert werden. Durch die hier vorgestellte Methode soll es möglich werden, beide Rezeptoren separat zu markieren, sobald sie die Zelloberfläche erreicht haben. Der Effekt der Stimulation beider Proteine durch verschiedene Liganden kann dann in der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden und die Kolokalisation von ET_AR und ET_BR bzw. die Unterschiede in der weiteren Verarbeitung sichtbar gemacht werden. Die folgenden Untersuchungen wurden von M.Sc. Philipp Wolf aus der Arbeitsgruppe von Prof. A.G. Beck-Sickinger (Universität Leipzig) durchgeführt.

Modifikation und Validierung von ET_A und ET_B

Zunächst sollte festgestellt werden, inwiefern die Peptide C-P1(E) und C-P2(E) als *tags* geeignet sind, ohne die native Funktionalität und Expression der Rezeptoren zu beeinflussen. Hierfür wurden Vektoren erzeugt, die für ET_AR-GFP und ET_BR-GFP kodieren und zusätzlich jeweils das C-P1(E)-, C-P2(E)- oder das bekannte C-E3-Peptid N-terminal tragen. Die Aktivität der transient exprimierten Mutanten auf der Oberfläche von HEK293-Zellen wurde über einen Calciumassay (Abb. 58A) und die korrekte Lokalisation über Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 58B) getestet. Die Stimulation beider Rezeptoren mit ET-1 führt zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-

4.4) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zur kovalenten Markierung

Konzentration, welche durch den calciumsensitiven Farbstoff Fura-2 ausgelesen werden kann.^[299] Allein die Mutante C-P2(E)-ET_BR-GFP erwies sich als nicht aktiv, was dazu führt, dass nur die Paarung C-P1(E)-ET_BR / C-P2(E)-ET_AR eine Option zur parallelen Markierung darstellt. In der Fluoreszenzmikroskopie unter Betrachtung der Expression im GFP-Kanal wurde deutlich, dass die Mutante C-P2(E)-ET_BR-GFP nicht an der Membran lokalisiert ist und somit keine Aktivität aufweisen kann. Die Variante C-P2(E)-ET_AR-GFP hingegen scheint in beiden Untersuchungen intakt. Erste Experimente zum Fluorophortransfer konnten allein mit dem TMR-Donor **TMR-P1(K) 69** durchgeführt werden, da alle Mutanten als GFP-Fusionsproteine vorliegen. Ein Transfer des Coumarin-Farbstoffs wäre auf Grund der ähnlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen nicht detektierbar. Eine Markierung des Rezeptors C-P1(E)-ET_BR-GFP bzw. des analogen ET_A-Rezeptors auf der Oberfläche von HEK293-Zellen mit Donor **69** erwies sich als erfolgreich. Dies belegt die Anwendbarkeit alternativer Coiled-Coil-Peptide über das bekannte System K3/E3 hinaus und stellt den ersten Schritt zur zellulären Anwendung orthogonaler Coiled-Coil-Markierungssysteme dar.

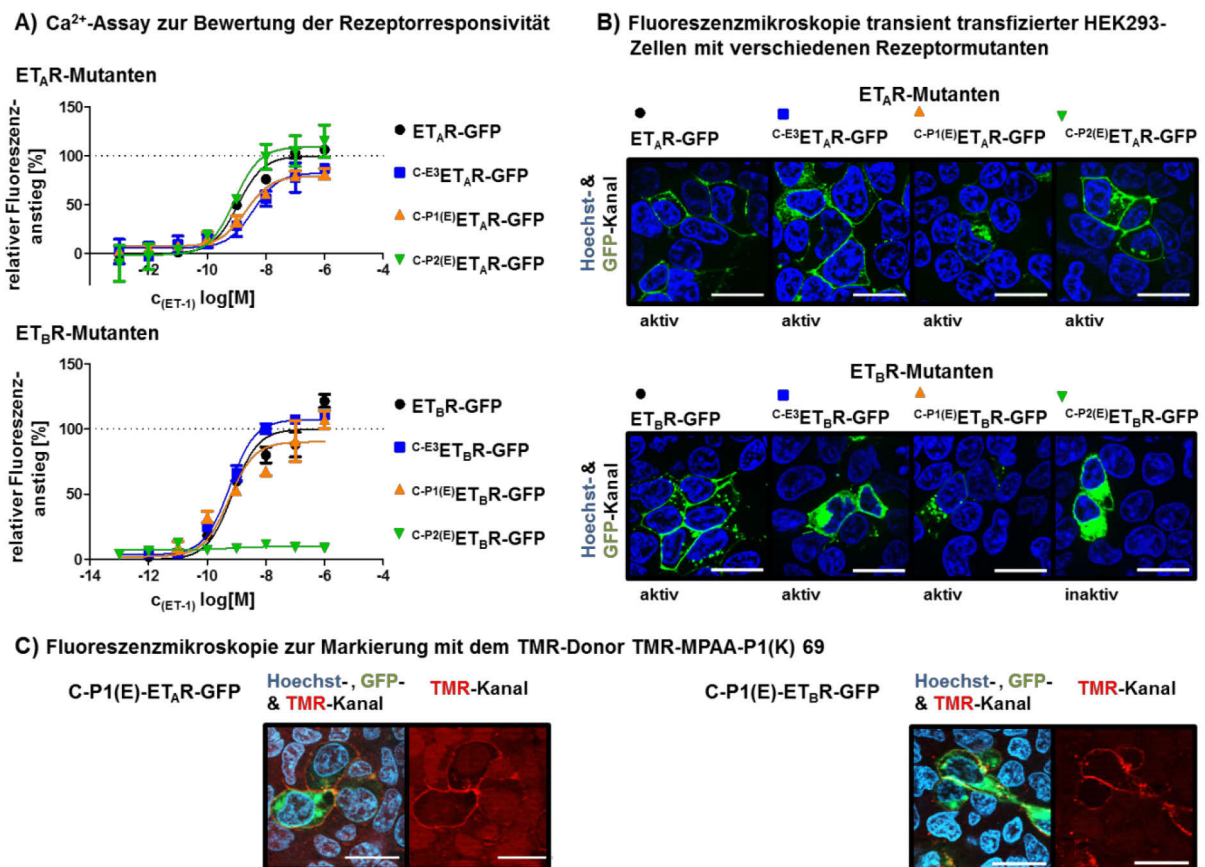


Abb. 58 Erste Ergebnisse zur Markierung zweier Rezeptoren des Endothelinsystems. A) Mit der jeweiligen Mutante transient transfizierte COS-7-Zellen wurden mit ET-1 stimuliert und der Fluoreszenzanstieg des Ca²⁺-sensitiven Farbstoffs detektiert. B) Die Lokalisation der modifizierten Rezeptoren in HEK293-Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie im GFP-Kanal überprüft. C) Erste Markierungsexperimente mit 200 nM Donor **69** wurden an der jeweiligen ET_AR- und ET_BR-Mutante durchgeführt.

4.4.6) Zusammenfassung von Kapitel 4.4)

In diesem Abschnitt wurde das Konzept des Coiled-Coil-vermittelten Fluorophortransfers über das K3/E3-Peptidpaar hinaus erweitert, mit dem Ziel, parallel zwei verschiedene Fluorophore, TMR und Coumarin343, selektiv auf zwei verschiedene Akzeptoren zu übertragen. Die literaturbekannten orthogonalen Coiled-Coil-Paare P1 und P2 bildeten dafür die Grundlage. Diese Peptide wurden jeweils als Fluorophor-Donor (Thioester-Peptid) und -Akzeptor (Cysteiny-Peptid) synthetisiert und zusätzlich eine um eine Heptade gekürzte Variante P1* untersucht. Letztere zeigte in der Transferreaktion jedoch kaum Produktbildung und wurde daher verworfen. Das P1-Peptidpaar wurde in Hinblick auf den Transfer von TMR und das Paar P2 auf den Transfer von Cou untersucht. Beide Systeme waren für den Fluorophortransfer anwendbar und in beiden Fällen erwies sich, dass die Wahl der positiv geladenen K-Peptide, also **P1(K)** bzw. **P2(K)**, als Donor und der negativ geladenen E-Peptide als Akzeptor als vorteilhaft. Das P1-System zeigte dabei eine besonders bemerkenswerte Reaktivität, da hier eine vollständige Umsetzung zum Produkt **P** und doppelten Transferprodukt **DTP** innerhalb von 15 s verzeichnet werden konnte! Wurden beide Transferreaktionen, also der Transfer von TMR über P1 und der Transfer von Cou über P2, simultan durchgeführt, so wurden die gewünschten Produkte **TMR-P1(E)** und **Cou-P2(E)**, sowie die entsprechenden Produkte des doppelten Transfers wieder gebildet. Es konnte keine Kreuzreaktivität beobachtet werden, was die Selektivität der Reaktionen bei 0.5 μM Peptidkonzentration belegt. In der Summe wurden 100% des Fluorophors TMR und 90% der Fluorophors Cou nach 10 min zum jeweiligen Produkt **P** bzw. **DTP** umgesetzt. Damit wurde ein System erzeugt, welches geeignet ist, zwei verschiedene Fluorophore auf zwei verschiedene Akzeptorpeptide selektiv, sehr effizient und schnell zu übertragen.

Erste Experimente zur zellulären Anwendung des parallelen Fluorophortransfers an den Rezeptoren ET_AR und ET_BR des Endothelinsystems zeigten, dass die Fusionsproteine C-P1(E)-ET_BR / C-P2(E)-ET_AR funktional und somit als Paar für weitere Untersuchungen geeignet sind. Der TMR-Donor **69** konnte genutzt werden, um die modifizierten Rezeptoren auf lebenden Zellen zu markieren.

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

4.5.1) Konzept der Peptid-Strangverdrängung

Die DNA-Strangverdrängung und -austausch

Oligonukleotide bieten über die Wahl und Anordnung der Nukleobasen sowie die Kontrollierbarkeit über Watson-Crick-Basenpaarung die Möglichkeit, räumlich klar definierte Strukturen zu erzeugen. Selbst große supramolekulare Gebilde sind über DNA-Origami-Technologie zugänglich und können zur Ausbildung präzise programmierbarer Strukturen genutzt werden.^[18] Neben statischen Formen können Oligonukleotide auch in kontrollierten dynamischen Prozessen eingesetzt werden, in welchen durch die Kodierung über die Basenpaare Stränge zur gezielten Hybridisierung bzw. Dissoziation bewegt werden. Eine Aneinanderreihung mehrerer steuerbarer Prozesse zu einer Elementkette generiert somit eine programmierbare Logikschaltung.^[210, 300] Am Ende eines solchen Schaltprozesses kann dann eine definierte Ausgabe (*output*) als Resultat einer bestimmten Eingabe (*input*) stehen. Zwei Einzelprozesse dominieren solche Logikschaltungen: die Einzelstrangverdrängung (*strand displacement*) und der Einzelstrangaustausch (*strand exchange*) (Abb. 59).^[223] Beide basieren auf einem DNA-Überhang – einer Sequenz, die zu Beginn nicht-hybridisiert vorliegt und als Anker für einen Eingabe-Strang fungieren kann. Die Einzelstrangverdrängung bewirkt als Ergebnis einer solchen „Eingabe“ in Form von Strang S_E die Auflösung von Komplex K_1 und Bildung von Komplex K_2 unter Freisetzung des Ausgabe-Strangs S_A (Abb. 59A). Das Resultat eines Strangaustauschs hingegen bleibt ein dynamisches Gleichgewicht. Der Eingabe-Strang S_E führt über die Zustände im Komplex K_2 , in welchem Strang S_E ($\gamma\delta$) und S_A ($\alpha\beta\gamma$) zeitgleich teils gebunden sind und Komplex K_3 , in welchem S_E vollständig und S_A teils hybridisiert ist, zum Komplex K_4 unter Freisetzung von S_A . Da durch die Sequenz β' ein neuer Überhang entsteht, ist der Prozess reversibel und kann genutzt werden, um weitere Prozesse auf Grundlage des freigelegten Teilstrangs β' einzuleiten (Abb. 59B). Diese Vorgänge beruhen nicht nur auf einer thermodynamischen Bevorzugung des jeweiligen Ausgabe-Duplex, sondern werden auch begünstigt durch die Strangwanderung (*branch migration*).^[300] Nach der Anlagerung des Eingabe-Strangs am Überhang kommt es in einer Art Zufallsbewegung zum Öffnen und Schließen des Duplex und somit zur allmählichen „Vorwärtsbewegung“ des Eingabe-Strangs S_E unter Verdrängung des Ausgabe-Strangs S_A . Die Kinetik der Verdrängung oder des Austauschs ist dabei abhängig von der Länge und Basenkombination des Überhangs, sodass die Geschwindigkeitskonstante im Bereich von $1 - 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ variiert. Ab einer Überhanglänge von sechs Nukleotiden findet kaum weitere Beschleunigung statt.^[300] Auf dieser Grundlage konnte in zahlreichen Beispielen die gezielte Gestaltung DNA-basierter Logikschaltgitter demonstriert werden.^[301-303]

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

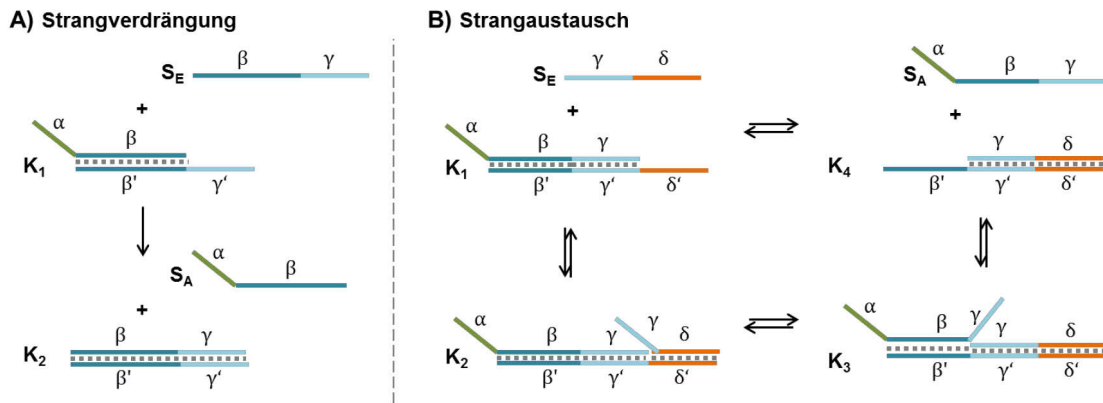


Abb. 59 Schema zur DNA-basierten A) Einzelstrangverdrängung (*strand displacement*) und dem B) Einzelstrangaustausch (*strand exchange*). Komplementäre DNA-Sequenzen werden als gleichfarbige Striche symbolisiert, eine Hybridisierung beider durch graue Punkte angedeutet.

Konzept der Peptid-Strangverdrängung

Inspiziert vom rationalen Design und der Gestaltungsvielfalt Oligonukleotid-basierter Logikschaltgitter sollte untersucht werden, ob derartig schaltbare Module auch auf Grundlage von Coiled-Coil-Peptiden erzeugt werden können. Auch Coiled-Coil-Peptide können gezielt gewählt werden, sodass bestimmte Dimere bevorzugt entstehen. Dies wurde bereits zur Erzeugung statischer, supramolekularer Strukturen genutzt (siehe Kapitel 2.2). Auch die Verwendung von Coiled-Coil-Peptiden in der Regulation von Reaktionskinetik ist bekannt und wurde in den vorhergehenden Kapiteln genutzt. Eine dynamische Anwendung, in welcher ein Eingabe-Peptid mit Regulation über einen peptidischen Überhang, die Freisetzung eines Ausgabe-Peptids bewirkt, wurde jedoch bislang nicht demonstriert. Ähnlich den Oligonukleotid-Systemen könnte ein peptidischer Überhang genutzt werden, um Coiled-Coil-Bindungen zu schalten. Dieses Konzept sollte im Folgenden systematisch untersucht werden (Abb. 60). Die Rolle der Peptidsequenz, der Sequenzlänge und Art des Überhangs sollten beleuchtet werden. Auch die Natur des Stammpeptidpaares, also des Peptids ohne Überhang, sollte untersucht werden. Werden die Peptide zusätzlich mit funktionalen Einheiten A und B versehen, so kann die Nähe zwischen selbigen über die Dynamik der Coiled-Coil-Peptidbindung reguliert werden. Andersherum, können die Einheiten A und B Auskunft über den Zustand des Peptidsystems geben und demnach zum Auslesen genutzt werden. Über die Markierung der Peptidstränge mit einem Fluorophor (F) bzw. einem Löscher (*Quencher*, Q) sollte die Bindung und induzierte Dissoziation beobachtet werden. Die Anwendbarkeit weiterer Funktionalitäten abseits fluoreszenter Einheiten sollte ebenso beleuchtet werden. Ein interessantes Beispiel für derartige Funktionalitäten liefern Liganden, deren Proximität weiterführende Prozesse einleiten kann und sie somit regulatorische Relevanz in biologischen Systemen besitzen.

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

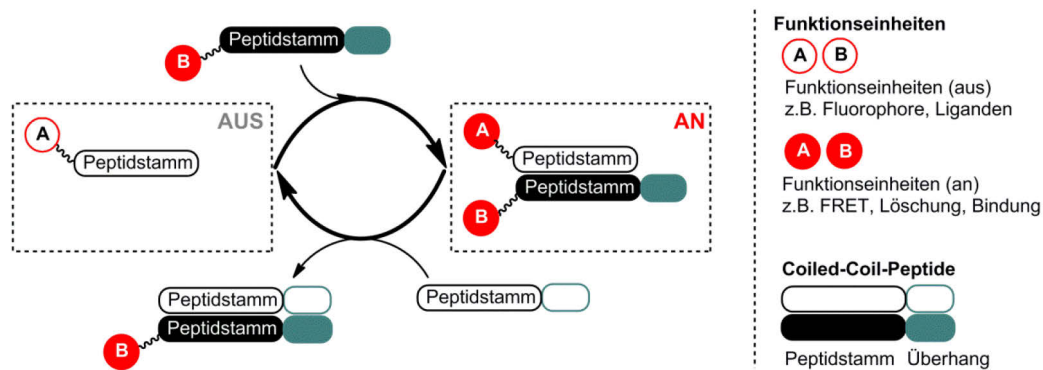


Abb. 60 Konzept der Peptid-vermittelten Verdrängung. Die Bindung zweier Peptide mit komplementären Peptidstämmen induziert ein „Einschalten“ der Funktionalitäten A und B. Durch Zugabe eines Eingabestrangs mit Überhang wird diese Bindung wieder gebrochen und die Funktion wieder „ausgeschaltet“.

4.5.2) Erste Generation: Schalten

Wahl des ersten Modellsystems

Ein erstes System zur Untersuchung der relativen thermodynamischen Stabilitäten der Strukturen und der Kinetik eines Verdrängungs- oder Austauschprozesses wurde auf Grundlage des K3/E3-Peptidpaars gestaltet. Dieses Peptidpaar ist hinreichend untersucht, bildet parallele Dimere und bietet sich somit an, die peptidische Stammregion zu bilden, die durch einen Überhang verlängert wird. Für eine gute Signalintensität in der fluoreszenten Untersuchung im Küvettenformat werden Konzentrationen von ca. 0.5 μM an Fluorophor erfordert. Mit einem K_D -Wert von 64 nM für die K3-E3-Interaktion ist damit eine Dimerisierung der Stammpeptidregion unter diesen Bedingungen gewährleistet. Das Bindungsereignis soll durch Fluoreszenzlöschung sichtbar gemacht werden. Während das E3-Peptid (EIAALEK)₃G, welches als Startpeptid gewählt wurde, N-terminal mit dem Fluorophor 5,6-Carboxyfluorescein (FAM) ausgestattet wurde, wurde das komplementäre K3-Peptid mit dem Löscher Dabcyl (Q) N-terminal verknüpft (Abb. 61). Zusätzlich wurde jeweils ein Überhang von zwei Heptaden angefügt. Dieser Überhang wurde so gewählt, dass die Sequenz eine Orthogonalität gegenüber den weiteren Verlängerungen mit sich bringt. Die Verwendung orthogonaler Coiled-Coil-Peptide wurde als vorteilhaft erachtet, da sie eine Selektivität der sich bildenden Strukturen vermittelt und analog DNA-basierten Systemen eine Sequenzspezifität bewirkt. Die in Kapitel 4.4 vorgestellten Peptidpaare wurden als Grundlage gewählt. Eingangs wurde ein schaltbares Modellsystem derart entwickelt, dass eine sukzessive Verlängerung der Peptide um je zwei Heptaden erfolgen sollte (Abb. 61A). Jeder eingeführte Überhang wird im darauffolgenden Schritt zum Teil des Peptidstamms und bewirkt eine Änderung in der Fluoreszenzintensität. In der Summe zeigt dieses System auf, inwiefern zwei Heptaden an spezifisch bindendem Überhang in der Lage sind immer längere und damit stabilere Systeme aufzubrechen.

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

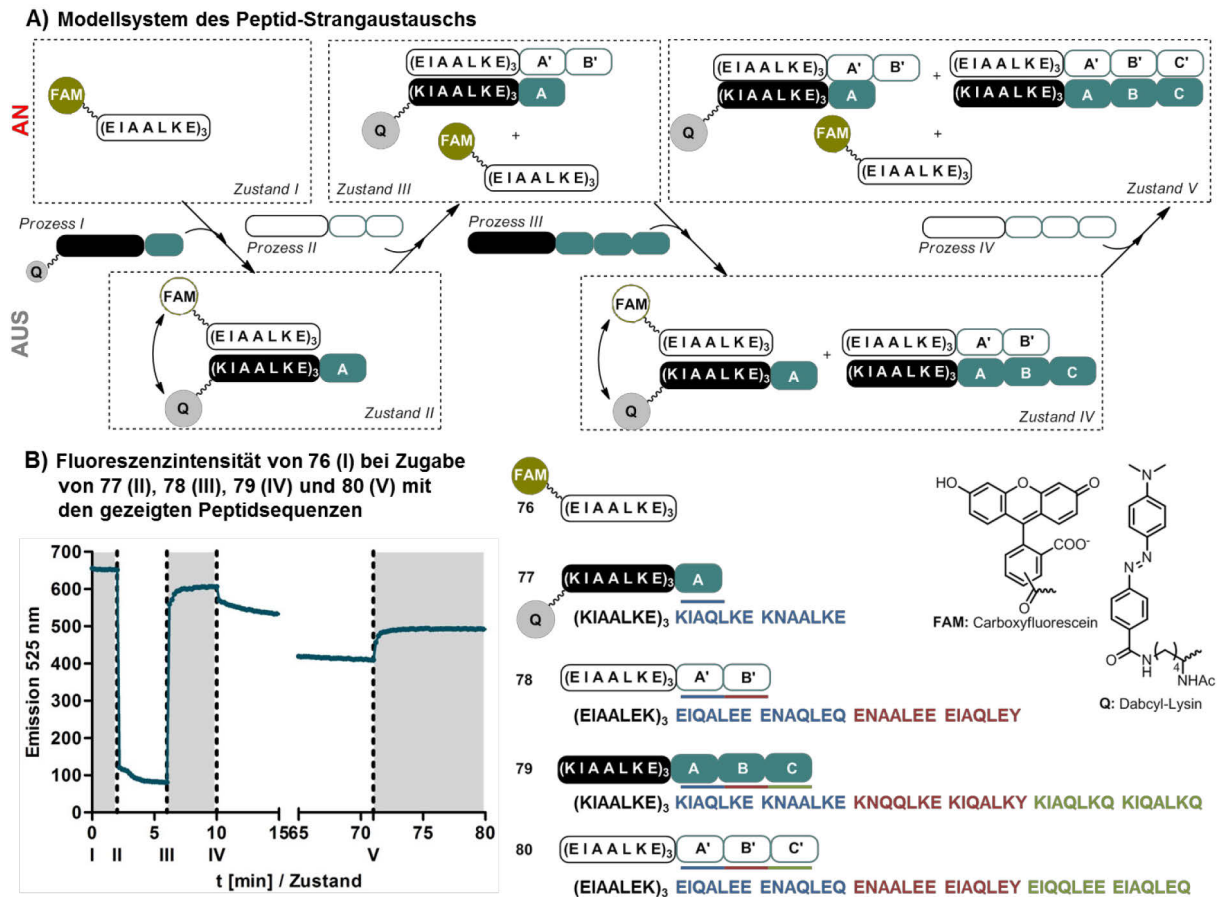


Abb. 61 Erstes Modellsystem zum überhangvermittelten Peptid-Strangaustausch. A) Schema der Schaltung zwischen „AN“ (fluoreszent) und „AUS“ (Fluoreszenz gelöscht) durch Zugabe eines jeweils um zwei Heptaden verlängerten Peptids. B) Verzeichnete Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Die gestrichelten Linien geben den jeweiligen Zeitpunkt der nächsten Peptidzugabe an. Rechts: Peptidsequenzen mit einzelnen Verlängerungen und den funktionellen Einheiten FAM und Q.

„AN“-„AUS“-Schaltung über Peptid-Strangaustausch

Da in diesem System immer wieder ein neuer „Verdrängungskeim“ in Form eines hinzukommenden Überhangs generiert wird, wird dieses gesamte Modell im Folgenden als Strangaustausch bezeichnet. Jeder einzelne Schritt in diesem Protokoll stellt allerdings eine Strangverdrängung dar, da es einen definierten, stabileren Komplex als Resultat geben sollte (Abb. 61B). Die verwendeten Peptide wurden über Peptidfestphasensynthese nach Fmoc-Strategie hergestellt. Alle Peptide wurden mit einem Glycin am C-Terminus hergestellt, was in den Darstellungen in diesem Kapitel zum Erhalt der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt wird. Trotz der teilweise beträchtlichen Länge von neun Heptaden, also entsprechend 63 Aminosäuren, kam es zu kaum nennenswerten Sequenzabbrüchen. Es soll an dieser Stelle doch nicht unerwähnt bleiben, dass vor allem lange Coiled-Coil-Peptide bei geringen Konzentrationen im mikromolaren Bereich gehandhabt werden sollten, da es sonst zur Aggregation kommen kann. Der Fluorophor FAM wurde N-terminal an das Startpeptid **76** gekuppelt. Der Fluoreszenz-

löscher Dabcyl (Q) fungiert als Kollisions- und Energietransferlöscher. Der gesamte Baustein Fmoc-Lys(Dabcyl)-OH, in dem Dabcyl über das ϵ -Amin von Lysin verbunden war, wurde an das komplementäre Peptid **77** geknüpft. In der Umsetzung des Modellsystems wurde zunächst das FAM-markierte Start-Peptid **76** in 0.5 μ M Konzentration in entgastem Puffer (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) vorgelegt und die Fluoreszenzintensität bis zur Signalstabilität gemessen (Abb. 61, Zustand I). Die Zugabe eines Äquivalents des Löscher-Peptids **77** mit zwei Heptaden Überhang (Prozess I) bewirkte innerhalb weniger Sekunden eine drastische Senkung der Fluoreszenzintensität und zeigt somit ein schnell eintretendes Bindungsereignis beider Peptide auf. Die Zugabe des um weitere zwei Heptaden ergänzten Peptids **78** führte rapide zu fast vollständiger Rekonstitution der Fluoreszenz (Prozess II). Prozess III hingegen verlief sehr langsam. Die zögerlich eintretende Löschung lässt auf eine gehemmte Verdrängung von Peptid **78** durch Peptid **79** schließen. Nach über einer Stunde war die Fluoreszenz immer noch weitgehend erhalten. Der Folgeschritt IV verlief wiederum schnell, allerdings unvollständig. Diese Entwicklung führt zu folgenden Schlussfolgerungen: i) der Verdrängungsprozess kann durch peptidische Überhänge eingeleitet werden und rapide ablaufen (Prozesse I – II). Die Effizienz der Verdrängung ist, gemäß der Amplitude der Fluoreszenzlöschung und -rekonstitution, in diesen Fällen sehr hoch; ii) große dimerisierte Strukturen, wie sie im fünf Heptaden langen Peptid **77** und dem sieben Heptaden langen Peptid **78** auftreten sind nicht mehr durch den gewählten Überhang zu lösen. Es ist anzunehmen, dass dieses Dimer zu geringe Dissoziationsraten aufweist, als dass der dazukommende Strang **79** eine Verdrängung bewirken könnte, auch wenn er thermodynamisch ein noch stabileres Dimer zur Folge hätte. Zusammenfassend ergibt sich, dass die Stammregion eher kurz gehalten werden sollte, um eine Verdrängung zu ermöglichen und zwei Heptaden Überhang ausreichen, um selbige einzuleiten. Der Prozess findet dann binnen Sekunden statt.

4.5.3) Zweite Generation: Kreislauf

Kreislauf mit orthogonalen Überhang-Peptiden

Wird nun der Peptidstamm gleichbleibend bei den drei Heptaden an K3/E3-Peptid gehalten und der Überhang von zwei Heptaden (A) bzw. (A') konstant beibehalten, so kann ein Wechsel zwischen „AN“ und „AUS“ erreicht werden, indem die Stöchiometrien der einzelnen Komponenten im System variiert werden. Der Überhang (A) kann weiterhin den Prozess der Verdrängung leiten und damit die Fluoreszenz rekonstituieren. Erneute Zugabe an Löscher-Peptid, also eine Erhöhung der Äquivalente, kann dementsgegen wieder die Fluoreszenz-

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Löschung hervorrufen. Diese Variation an Äquivalenten und konzentrationsabhängige Verdrängung, wie sie in Abb. 62A skizziert ist, kann in einem Kreislauf zur stetigen „AN“- und „AUS“-Schaltung genutzt werden. Dieses alternative Konzept sollte allein mit den Peptiden **76**, **77** und **78** demonstriert werden. FAM-markiertes Start-Peptid **76** wurde in 0.5 μM Konzentration in entgastem Puffer (100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) vorgelegt und nach Verzeichnung der Fluoreszenzintensität alternierend Löscher-Peptid **77** oder Rekonstitutions-Peptid **78** in je einem Äquivalent zum Start-Peptid hinzugegeben. Das Schalten zwischen „AN“ und „AUS“ erfolgte schnell und insgesamt sieben Zyklen konnten durchlaufen werden, bevor die Signalamplitude zu gering wurde, um die Zustände deutlich zu unterscheiden. Das stetige Sinken der Löscheffizienz bzw. Wiederherstellung der Fluoreszenz wird mutmaßlich durch die steigende Gesamtkonzentration an Peptid in Lösung bedingt. Unspezifische Löschung nimmt zu und größere Strukturen aus mehr als zwei Peptiden werden wahrscheinlicher. Dies zeigt sich auch in den zunehmenden Schwankungen bei Erlangen der Plateaus. Nichtsdestoweniger stellt dieses System mit sieben Zyklen eine beachtliche Kontrolle über Induktion und Reversibilität einer gewünschten Ausgabe, hier Fluoreszenz, dar. Es wurde deutlich gemacht, dass durch Coiled-Coil-Peptid-Systeme mit Hilfe eines sequenzspezifischen Überhangs molekulare Schaltsysteme gestaltet werden können. Die verwendeten zwei Heptaden an Überhang vermittelten in dem gewählten Modell durch Orthogonalität klar definierte Strukturen. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Länge des Überhangs notwendig ist. Eine Kürzung vereinfacht zum einen die Synthese und beugt Aggregation vor, falls das Peptidsystem in hohen Konzentrationen vorliegen soll. Damit könnten mehr Zyklen durch eine dauerhaft hohe Amplitude in Aussicht gestellt werden. Da mit Kürzung der Sequenz auch der selektive Charakter verloren gehen kann, sollte zeitgleich die Frage nach dem Bedarf an Orthogonalität gestellt werden.

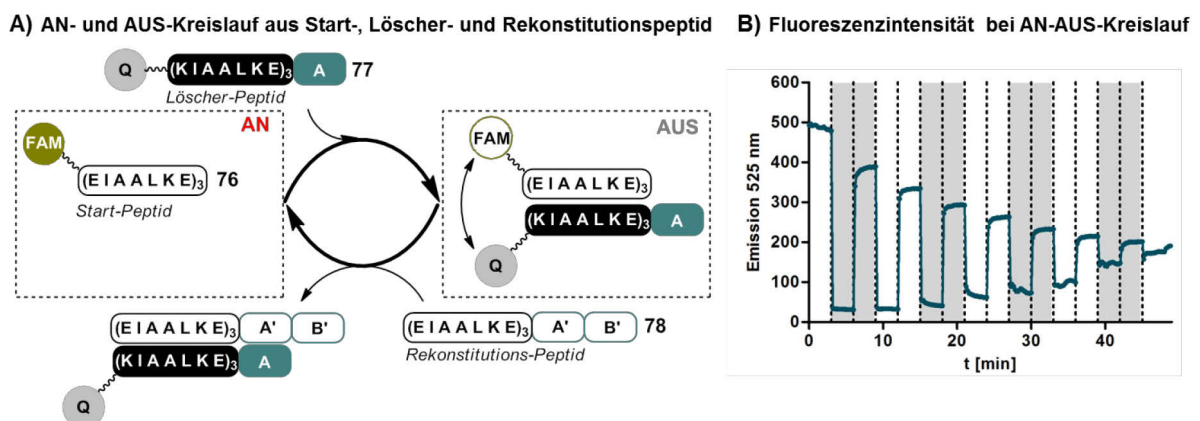


Abb. 62 Erweitertes Modell zur Schaltbarkeit zwischen „AN“ und „AUS“ über stöchiometrisch kontrollierte Verdrängung. A) Konzept einer zyklischen Schaltbarkeit. B) Verzeichnete Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ bei alternierender Zugabe von Löscherpeptid **77** und Rekonstitutions-Peptid **78** zu Startpeptid **76** (Zugabe wird durch gestrichelte Linien gekennzeichnet und erfolgte in zeitlichen Abständen von je 3 min).

Rolle des Peptid-Überhangs in der Peptid-Strangverdrängung

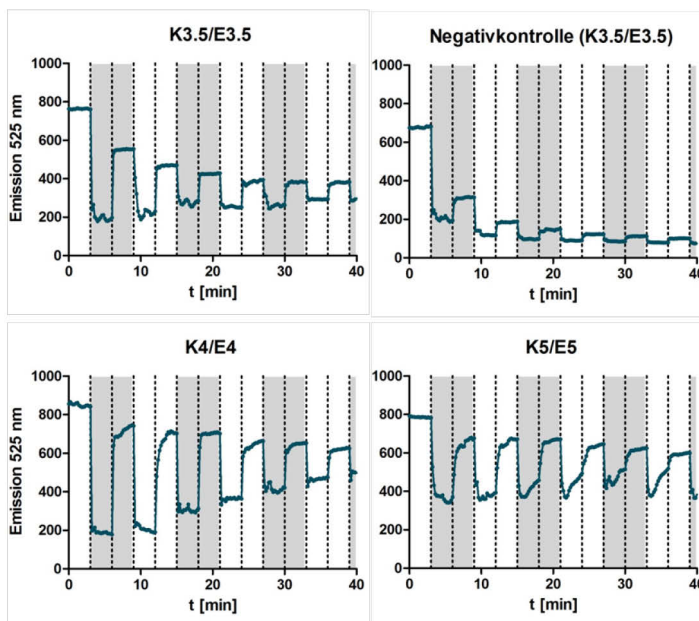
Im Folgenden wurde die Natur des Überhangs variiert und der Einfluss auf die Signalamplitude als Parameter der Lösch- und Rekonstitutionseffizienz untersucht werden. Die Stammregion aus K3 und E3 wurde beibehalten. Die Sequenzen der alternativen Überhänge basierten ebenfalls auf dem K3/E3-Paar und wurden in einer Länge von je 0.5 Heptaden (D), einer Heptade (E) oder zwei Heptaden (F) gewählt (Abb. 63). Der Kreislauf analog Abb. 62A wurde über Start-Peptid **76** begonnen und alternierend wurde je ein Äquivalent an Löscher- und Rekonstitution-Peptid hinzugegeben, wobei das zugegebene Peptidpaar jeweils die verlängerten Coil-Coil-Komplexe D/D' (K3.5 / E3.5), E/E' (K4 / E4) oder F/F' (K5 / E5) bilden kann. Die Ergebnisse in der Änderung der Fluoreszenz bei Zugabe des nächsten Peptids sind für diese Beispiele in Abb. 63A gezeigt. Die Zugabe, angedeutet durch eine gestrichelte Längslinie, erfolgte in Zeitabständen von je 3 min unabhängig davon, inwieweit ein Gleichgewicht erreicht wurde. Zyklen aus „AUS“ und „AN“ sind jeweils durch die wechselnde Hintergrundfarbe grau/weiß gekennzeichnet. Bereits durch die Erweiterung um nur eine halbe Heptade D/D' (K3.5/E3.5) konnte ein AN-AUS-Kreislauf wie zuvor geschaltet werden (Abb. 63A, oben links). Insbesondere die Geschwindigkeit, in der sich das Gleichgewicht einstellt und das Plateau erreicht wurde, ist bemerkenswert. Im direkten Vergleich dazu wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in welchem das gleiche Paar aus Löscher- und Rekonstitutions-Peptid verwendet und lediglich ein anderes Start-Peptid **87** mit einer Länge von ebenfalls 3.5 Heptaden, gewählt wurde (Abb. 63A, oben rechts). Ein Schalten war hier kaum möglich. Dadurch, dass das alternative FAM-markierte Start-Peptid **87** über die gleiche Länge verfügte, wie das Löscher- und Rekonstitutions-Peptid, entfiel der Effekt des Überhangs. Somit fehlte zum einen ein Initiator, der die Verdrängung begünstigen könnte und zum anderen entfiel der thermodynamische Vorteil, den das Rekonstitutions-Peptid in der Stabilität der resultierenden Dimerbildung mit dem Löscher-Peptid im Vergleich zum Start-Peptid hat. Die Verteilung zwischen Start- oder Rekonstitutions-Peptid-gebundenem Löscher-Peptid **81** ergibt sich dann in einer z.T. eher statistischen Weise und führt mit steigender Konzentration an Rekonstitutions- und Löscher-Peptid und somit einem Überschuss an Rekonstitutions-Peptid im Vergleich zum Start-Peptid zu einem Ausbleiben der Fluoreszenz nach wenigen Zyklen.

Die Verlängerung des Überhangs auf eine volle Heptade E im Kreislauf mit Start-Peptid **76** führte weiterhin zu einem schnellen Erreichen des Gleichgewichts und zeigte zudem eine größere Signalamplitude (Abb. 63A, unten links). Das ermöglichte die Schaltung von insgesamt elf Zyklen (25 Peptidzugaben) und damit wesentlich mehr, als mit zwei Heptaden an orthogonalem Überhang. Eine ähnliche Anzahl von zehn Zyklen gelang ebenfalls durch zwei Heptaden Verlängerung F (Abb. 63A, unten rechts). Allerdings zeigte sich hier eine Besonderheit im Fluoreszenzverlauf: nach einem ersten, rapiden Absinken der Fluoreszenz bei Zugabe des

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Löscher-Peptids fand ein allmählicher Reorganisationsprozess statt, der sich in einem Wiederanstieg der Fluoreszenz zu einem höheren Plateau zeigte. Dies ist mutmaßlich die Folge langer, repetitiver Coiled-Coil-Motive. Komplementäre Peptide müssen nicht zwangsläufig in einer 1:1-Stöchiometrie vorliegen. Es können mehrere E-Coiled-Coil-Peptide ein K-Peptid räumlich versetzt binden und umgekehrt. Reorganisationsprozesse von einer in eine andere oligomere Struktur werden dann bevorzugt.^[304] Je länger die repetitive Sequenz – D, E oder F – und je höher die Konzentration in der Lösung – Zyklus 1, 2, 3 etc. - umso stärker ist dieser Effekt ausgeprägt.

A) Fluoreszenzintensität für den AN-AUS-Kreislauf



B) Peptide für Kreislauf und Negativkontrolle

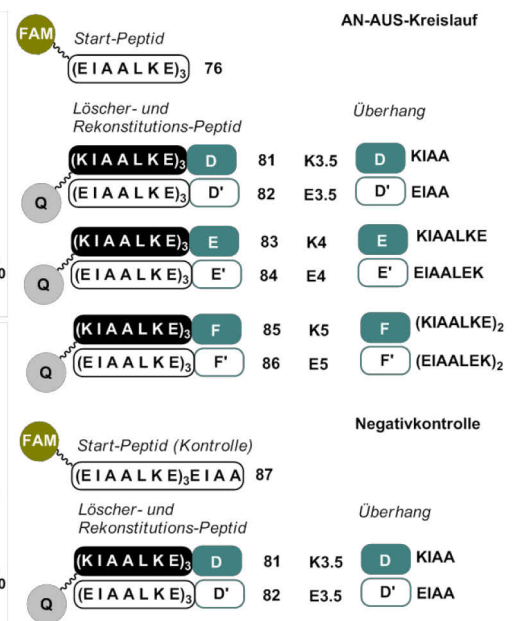


Abb. 63 AN-AUS-Kreislauf mit gleicher Stamm- und variabler Überhanglänge. A) Fluoreszenzintensität von 0.5 μ M FAM-Startpeptid ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm) bei alternierender Zugabe von Löscher- und Rekonstitutions-Peptid in zeitlichem Abstand von 3 min. Startpeptid 76 mit den Paaren 81 / 82 (oben, links), 83 / 84 (unten, links) und 85 / 86 (unten, rechts). Kontrolle mit 0.5 μ M Start-Peptid 87 und Zugabe von 81 / 82 (oben, rechts). B) Sequenzen der verwendeten Peptide.

Es konnten also für die Überhänge D (9 Zyklen), E (11 Zyklen) und F (10 Zyklen) ähnliche Anzahlen an Zyklen geschaltet werden. In Hinblick auf eine spätere Anwendung ist der Parameter der Amplitude des Signals allerdings bedeutender, da hiermit die Effizienz der Ausbildung eines bestimmten „AN“- oder „AUS“-Zustands gekennzeichnet wird. Eine quantitative Auswertung wurde derart vorgenommen, dass die relative Amplitude pro Zyklus je System rechnerisch bestimmt wurde. Hierfür wurde die Amplitude als Differenz aus maximaler Fluoreszenz im AN-Zustand und minimaler Fluoreszenz im AUS-Zustand ins Verhältnis mit der Startfluoreszenz des reinen FAM-Peptids gesetzt (Gln. 3). Die daraus resultierenden relativen Amplituden wurden für die Negativkontrolle, sowie die drei untersuchten Überhänge D, E und F in Abb. 64A nebeneinander aufgetragen. Um die ermöglichten Zyklen zu zählen und die

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Vergleichbarkeit zu vereinfachen, wurde ein Grenzwert von 5% willkürlich festgelegt. Kleinere Amplituden sind als solche nicht mehr gut zu erkennen. Allgemein ist ein Sinken der Amplitude entlang der Zyklen zu verzeichnen. Das Kontrollsystem erlaubte allein drei Zyklen, bevor der Grenzwert unterschritten wurde. Die maximale Amplitude wird mit einer Heptade Überhang im System K4/E4 erreicht. Diese Länge scheint ausreichend zu sein, um einen thermodynamischen Unterschied zwischen Start- und Rekonstitutions-Peptid zu erzeugen und dennoch nicht so lang, als das höhergeordnete Strukturverbände aus mehr als zwei Peptiden gebildet werden und den Schaltprozess stören würden.

Gleichung 3:

$$rel. Amplitude = \frac{F_{AN}^Z - F_{AUS}^Z}{F_{START}}$$

F – Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 525$ nm (Durchschnitt der Messwerte von Minute 2 – 3 nach Zugabe des Peptids)

Z – Zyklusnummer

F_{START} – Fluoreszenzintensität des reinen Startpeptids

Diesen thermodynamischen Stabilitätsvorteil, den der Überhang mit sich bringt, macht der Vergleich der Stabilitäten der einzelnen Dimere in Form von thermischen Denaturierungsexperimenten erkennbar. Die FAM- und Q-markierten Peptidpaare wurden jeweils $0.5 \mu\text{M}$ in entgastem Puffer erhitzt und die Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Auflösen der Dimere aufgezeichnet. Als Schmelztemperatur wurde der Wendepunkt, an welchem das System zu 50% in Einzelsträngen vorliegt, aus dem Maximum der ersten Ableitung bestimmt (Abb. 64B). Während bei den Systemen E3/K3 und E3.5/K3.5 ohne Zugabe von chaotropen Agentien ein Kurvenverlauf erkennbar war, musste 3 M Guanidiniumhydrochlorid ($\text{Gnd} \cdot \text{HCl}$) zum Puffer hinzugegeben werden, um ein Aufbrechen der Dimere längerer Coiled-Coil-Peptide zu ermöglichen. Schon im Vergleich von E3/K3 und E3.5/K3.5 zeigte sich ein Unterschied von 25°C , was bereits eine enorme Stabilisierung der Coiled-Coil-Interaktion durch vier weitere Aminosäuren bedeutet. Bei der Betrachtung der Denaturierung des Paares K5/E5 ist kein klarer sigmoidaler Kurvenverlauf mehr erkennbar. Es kommt zunächst zu einem Sinken der Fluoreszenz, bevor das Signal ansteigt. Es kann angenommen werden, dass mit steigender Länge der Peptide offenbar komplexere Strukturen entstehen. Der Fluoreszenzverlauf lässt sich erklären, wenn erst eine Art von Struktur unter Bildung einer neuen gebrochen wird und nachfolgend die Dissoziation einsetzt. Dies ist nicht der Fall, wenn eine Teilsequenz räumliche Selektivität in die Ausbildung der Dimerstrukturen bringt, wie es bei dem vier Heptaden langen Überhang A-B/A'-B' zutrifft. Eine hohe Stabilität geht mit einem klaren sigmoidalen Verlauf der thermischen Denaturierung einher.

Aus diesen Untersuchungen kann über die stabilisierende Wirkung des Überhangs und die Rolle des Stammpeptids folgendes festgehalten werden:

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

- i) Der Überhang sollte ausreichend lang sein, um eine bevorzugte Bindung des Rekonstitutions- an Stelle des Start-Peptids zu bewirken. Dies ist schon bei einer halben Heptade Überhang möglich (siehe Abb. 63)
- ii) Der Überhang und das Stammpeptid sollten die Ausbildung klar definierter Dimere bewirken. Lange, repetitive Motive, wie in K5/E5-Peptidpaaren sind daher zu vermeiden, da multiple Bindungsoptionen und komplexere Strukturen auftreten können (vergl. Abb. 62 / Abb. 63).
- iii) Das Stammpeptid-Dimer sollte einerseits stabil genug sein, um unter den gewählten Bedingungen eine Bindung einzugehen. Allerdings führt eine zu hohe Stabilität und damit einhergehend zu geringe Dissoziationsraten zum Erliegen des Verdrängungsprozesses, wie es im ersten Modellsystem zu beobachten war. Das K3/E3-System bietet ein durchaus geeignetes Stammpeptid (siehe Abb. 61).

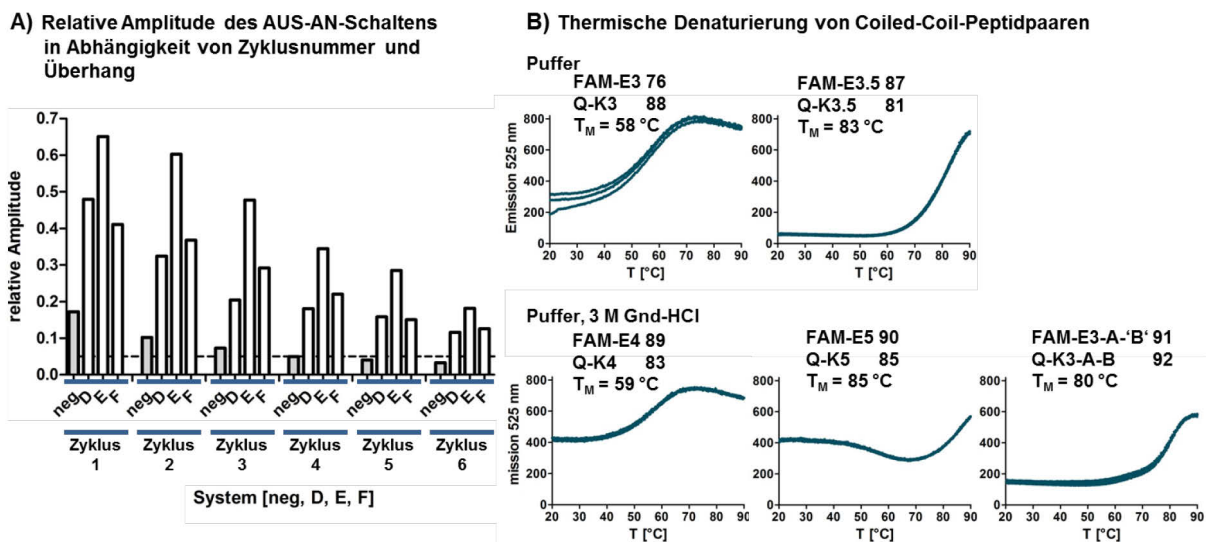


Abb. 64 Einfluss der Länge des Überhangs auf die Signalamplitude und die Bindungsstabilität. A) Graphischer Vergleich der relativen Amplituden pro Zyklus 1 – 6 für die Systeme mit Überhang D, E und F, sowie die Negativkontrolle (grau). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den gewählten Grenzwert von 5%. B) Denaturierungsexperimente der einzelnen Dimere. Peptide wurden in 1:1-Stöchiometrie in je 0.5 μM Konzentration in entgastem Puffer (obere Reihe) oder Puffer mit 3 M Guanidiniumhydrochlorid (untere Reihe) vorgelegt. Die Messungen wurde dreifach ausgeführt und über die erste Ableitung die Schmelztemperatur T_M ermittelt.

4.5.4) Anwendung an der Syk-Kinase

Konzept der Bindungsregulation durch Peptid-Strangverdrängung

Aus den Ergebnissen des vorherigen Teilkapitels geht hervor, dass das Peptidpaar E4/K4 besonders geeignete Eigenschaften zeigt, um eine deutliche Schaltung zwischen zwei Zuständen zu erzeugen. Es weist die höchste Amplitude auf und zeigt keine Anzeichen von Aggregation

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

oder unerwünschten, komplexeren Strukturen. Ein System auf Basis der Peptide E3, K4 und E4 sollte im Folgenden derart erstellt werden, dass eine Proteinbindung gezielt induziert oder gebrochen werden kann. Ein solches System steht stellvertretend für molekulare Prozesse, in denen Proximitätserhöhung und Multivalenz eine Rolle spielen. In dem hier gewählten Beispiel wurde die Ligandenbindung der Syk-Kinase modelliert. Bei Syk handelt sich um eine cytosolische Tyrosinkinase, die in der Weitergabe von T- und B-Zellrezeptorsignalen eine Rolle spielt.^[305-307] Sie besteht aus zwei SH2-Domänen, welche jeweils das peptidische Erkennungsmotiv pYXXI/L binden (Abb. 65A). Dabei sind die mit „X“ gekennzeichneten Positionen variabel. Es ist allerdings von Bedeutung, dass der Tyrosinrest phosphoryliert vorliegt. Die Bindungsaffinität von Syk für Peptidliganden ist abhängig von der Art der Präsentation sowie der „Valenz“ des Motivs. Monovalente Liganden, also Peptide, in welchen das Motiv pYXXI/L nur einmal vertreten ist, weisen geringe Affinitäten mit K_D -Werten im mikromolaren Bereich auf. Mit einem geeigneten Linker verbunden, etwa einer passenden Peptidsequenz mit geeignetem Abstand und räumlicher Orientierung erreichen bivalente Systeme mit zweifacher Präsentation des Motivs K_D -Werte im zweistellig-nanomolaren Bereich.^[308] Immunorezeptoren präsentieren solche zweifach phosphorylierten Peptidmotive, so genannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), zur Signaltransduktion.^[305] Artifizielle Systeme zur bivalenten Präsentation von Syk-Liganden an DNA-Gerüsten oder an der Seitenkette von Coiled-Coil-Peptiden wurden von Eberhard *et al.* und Marczyne *et al.* bereits demonstriert.^[162, 163]

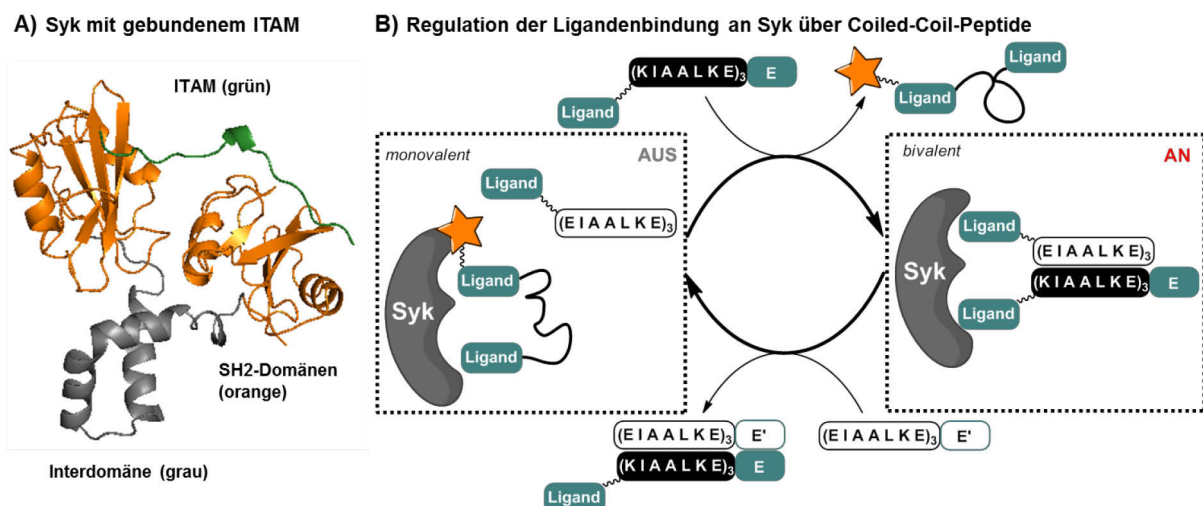


Abb. 65 Coiled-Coil-vermittelte Schaltbarkeit von Bindungszuständen am Beispiel von Syk. A) Röntgenkristallstruktur von Syk mit einem gebundenen ITAM-Liganden (RCSB PDB: 1A81).^[309] B) Konzept der Induktion und Inhibition von Bivalenz eines Syk-Liganden. Als Kompetitor zur Detektion des Bindungsmodus wurde ein fluoreszent markiertes Referenz-Peptid gewählt, in dem die phosphorylierte Erkennungssequenz zweifach präsentiert wird.

Die Anwendung der gezielten Coiled-Coil-vermittelten Strangverdrängung am Beispiel von Syk ist in Abb. 65B schematisch dargestellt. Das Ligand-verknüpfte Start-Peptid E3 besitzt zunächst eine geringe Affinität für Syk, da der Ligand gegenüber dem Protein monovalent präsentiert wird. Das System befindet sich im Zustand „AUS“. Wird das komplementäre, Ligand-tragende Peptid K4 hinzugegeben, induziert die Interaktion der Coiled-Coil-Peptide eine Proximität und stellt somit im Gesamtbild ein bivalentes System dar. Dieses kann von Syk erkannt und gebunden werden. Das System befindet sich im Zustand „AN“. Um die Bindung wieder zu lösen, kann nun Rekonstitutions-Peptid E4 hinzugegeben werden. Dieses verdrängt das Ligand-E3-Peptid nach vorher beschriebenen Mechanismen von Stabilität und Stöchiometrie und bewirkt somit den Wechsel von Bi- zu Monovalenz. Die Liganden besitzen erneut eine geringere Affinität für Syk und der Zustand wird wieder auf „AUS“ geschaltet.

Um den Wechsel zwischen „AUS“ und „AN“ erkennbar zu machen wurde die Messmethode der Fluoreszenzanisotropie gewählt, durch welche der Grad der Polarisationsänderung in Bezug auf die fluorophorspezifische Anregung und Emission von polarisiertem Licht gemessen wird. Basierend auf diesem Messprinzip wurde ein Assay angewandt, in welchem ein Fluorophor-tragendes Referenz-Peptid derart gewählt wurde, dass es bivalent das Syk-Bindungsmotiv trägt und somit einen Kompetitor zum Coiled-Coil-basierten bivalenten Ligandensystem bildet (Abb. 65B). Liegt das Ligandensystem monovalent vor, so ist das Referenz-Peptid gebunden und die Anisotropie hoch. Wird das System zur Bivalenz geschaltet, so ist es in der Lage das Referenz-Peptid zu verdrängen. Letzteres befindet sich daraufhin in Lösung und die Anisotropie sinkt. Das Referenz-Peptid fungiert demnach als indirekter Reporter und ermöglicht es, das Ligand-präsentierende Coiled-Coil-System ohne weitere Modifikationen zu verwenden.

Das Coiled-Coil-basierte, bivalente Ligandensystem

Das Referenz-Peptid wurde analog den bisherigen Messungen von Eberhardt *et al.* und Marczynke *et al.* mit dem Fluorophor FAM ausgestattet und mit der folgenden Sequenz gewählt: FAM-KpYTGLNTRSQETpYETLG.^[162] Das Einbringen der Phosphotyrosineinheiten erfolgte wie beschrieben durch Kupplung des geschützten Bausteins Fmoc-pTyr(NMe₂)₂-OH in der Peptid-Festphasensynthese. Zum Teil konnte nach Abspaltung unter sauren Bedingungen und Zugabe von Wasser die Bildung eines Depsipeptids durch N→O-Acylumlagerung, wie sie für Threonin in indirekter Nachbarschaft zu Phosphotyrosin beschrieben wurde, beobachtet werden.^[310] Diese Umlagerung wurde in die ursprüngliche Amidbindung überführt, indem das Peptid in Puffer bei pH 7.0 gehalten wurde. Die vollständige Rückbildung des Depsipeptids wurde über UPLCTM-MS sichergestellt.

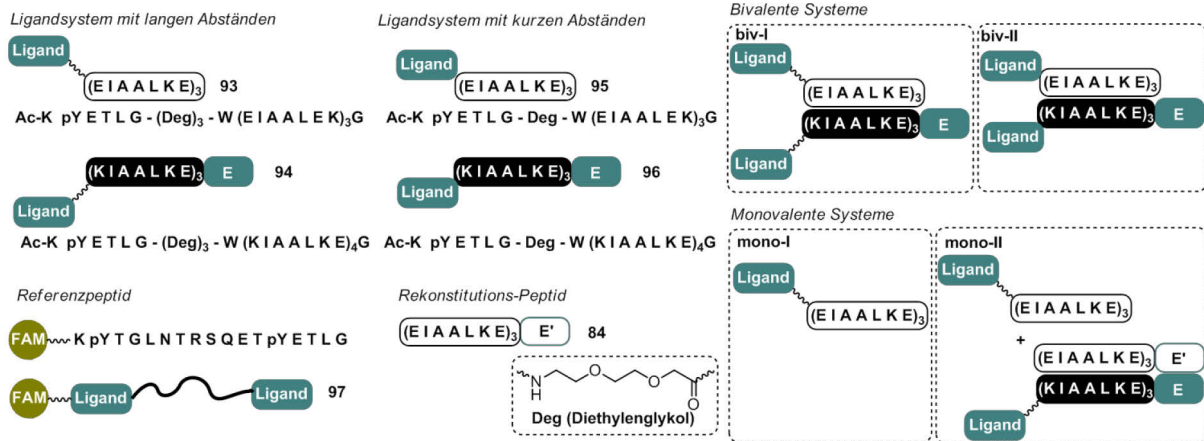
4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Die Coiled-Coil-Peptide E3 und K4 wurden je N-terminal mit dem Liganden Ac-KpYETLG versehen, sowie einer Diethylenglykoleinheit zur Erhöhung des Abstands und der Flexibilität, und Tryptophan zur besseren Quantifikation (Abb. 66A, **95**, **96**). Eine alternative Variante mit drei Diethylenglykoleinheiten, Peptide **93** und **94**, zur weiteren Abstandserhöhung wurden ebenfalls untersucht. Das exprimierte Protein Syk wurde auf seine Aktivität geprüft, indem die Bindungsaffinität zum Referenz-Peptid **97** über Fluoreszenzanisotropie bestimmt wurde. Der resultierende K_D -Wert von 85 ± 15 nM lag im erwarteten Bereich (Abb. 66B).^[310] Als Grundlage für die Schaltbarkeit von mono- zu bivalent wurde evaluiert, ob das Coiled-Coil-basierte Dimersystem in der Lage, ist Syk zu binden und damit das Referenz-Peptid **97** zu verdrängen. Hierfür wurden Konkurrenzexperimente vorgenommen, in denen die effektive Konzentration (EC_{50}) an bivalentem Ligand-Coiled-Coil-System ermittelt wurde, die für eine halbmaximale Verdrängung notwendig ist (Abb. 66C). Das Referenz-Peptid **97** wurde in 20 nM Konzentration vorgelegt und die minimale Anisotropie des Systems gemessen. Bei Zugabe von 200 nM Syk wurde das Referenz-Peptid vollständig gebunden und die Anisotropie erreicht ein Maximum. Nun wurde das Verdrängungssystem, **biv-I** oder **biv-II**, in steigenden Inkrementen zugesetzt und die Anisotropie gegen den Logarithmus der Konzentration des Titrators aufgetragen. Zum Vergleich wurden auch monovalente Systeme gemessen, um den Spielraum und Konzentrationsbereich für das „AN“- und „AUS“-Schalten zu ermitteln. Zweierlei monovalente Systeme wurden hierbei berücksichtigt: bei **mono-I** handelt es sich um das reine Ligand-E3-Peptid **93**. Dieses wurde in einer Konzentration von bis zu 40 μ M zum Syk-gebundenen Referenz-Peptid hinzutitriert. Bei **mono-II** handelt es sich um ein System, welches zwar beide Ligand-tragenden Coiled-Coil-Peptide **93** und **94** beinhaltet, aber ebenso das Rekonstitutions-Peptid **84**. Dieses System wurde bis zu einer Konzentration von 20 μ M hinzutitriert. Zu beachten ist, dass **mono-II** doppelt so viele Liganden enthält wie **mono-I** und daher nur die halbe Konzentration erforderlich war, um das Anisotropieminimum zu erreichen.

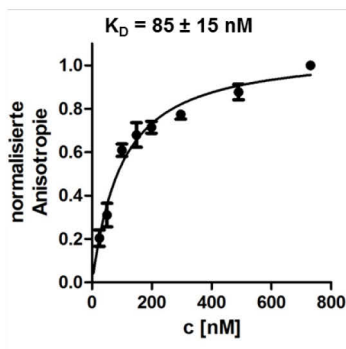
Es zeigte sich, dass mit dem Ligandensystem **biv-II** mit einem kurzen Abstandhalter zwischen Ligand und Coiled-Coil-Peptid nur ein EC_{50} -Wert von 4.66 μ M erreicht wurde. Im Vergleich dazu konnten in Vorarbeiten am Syk-Protein durch bivalente Präsentation der Liganden an DNA-Gerüsten Werte von 180 – 880 nM erzielt werden.^[310] Das flexiblere System **biv-I** mit längeren Ethylenglykoleinheiten kommt mit 1.09 μ M diesen Werten näher und zeigt im direkten Vergleich mit dem monovalenten System **mono-I**, mit einer effektiven Konzentration von 11.9 μ M, einen deutlichen Bivalenzeffekt. Wie zu erwarten war, weisen **mono-I** und **mono-II** ($EC_{50} = 10.9$ μ M) ähnliche EC_{50} -Werte auf, da in beiden Fällen eine monovalente Präsentation vorliegt. Hierbei wird bestätigt, dass die Zugabe von Rekonstitutions-Peptid **84** eine fast vollständige Dissoziation des Peptidpaars bewirkt.

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

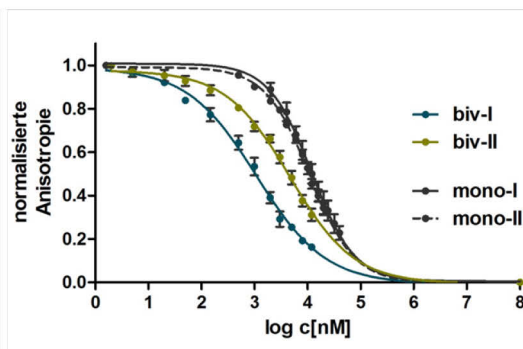
A) Peptidsequenzen zur Bindungsregulation und daraus erzeugte bi- und monovalente Systeme



B) Bestimmung der Bindungsaffinität von Referenz-Peptid 97 zu Syk



C) Verdrängungsexperimente zu bi- und monovalenten Systemen



| | |
|---|--|
| biv-I (bis 12 μM) | |
| $EC_{50} = 1.09 \mu\text{M}$ | |
| biv-II (bis 12 μM) | |
| $EC_{50} = 4.66 \mu\text{M}$ | |
| mono-I (bis 40 μM) | |
| $EC_{50} = 11.9 \mu\text{M}$ | |
| mono-II (bis 20 μM) | |
| $EC_{50} = 10.9 \mu\text{M}$ | |

Abb. 66 Peptide und Vorversuche zur kontrollierten Schaltung der Syk-Affinität. A) Bi- und monovalente Peptidsysteme: **biv-I** / **biv-II** bzw. **mono-I** / **mono-II**. Bivalenz wurde erreicht, indem die Peptide **93** und **94** mit langem oder **95** und **96** mit kurzem Abstandhalter verwendet wurden. Diese Bivalenz kann durch Zugabe von Rekonstitutions-Peptid **84** gebrochen werden. Die Anisotropie des Referenz-Peptids **97** ist die dabei gemessene Größe. B) Der K_D -Wert von 85 nM bestätigt die Aktivität von Syk. Aus dem Kurvenverlauf kann zudem eine annähernd vollständige Bindung des Referenz-Peptids bei 200 nM Syk geschlussfolgert werden. Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA mit 20 nM Referenz-Peptid **97**. C) Verdrängungsexperimente zu den einzelnen bi- und monovalenten Systemen. Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA mit 20 nM Referenz-Peptid **97**.

Reversible Induktion von Bivalenz an Syk-Liganden

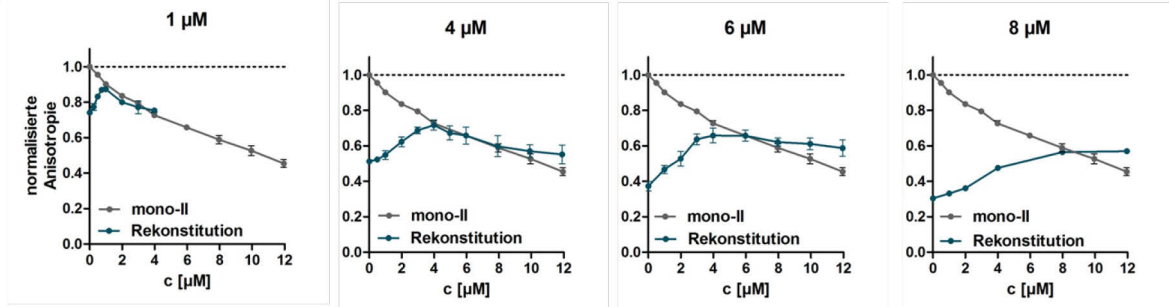
Aus den vorhergehenden Experimenten wird deutlich, dass bei gleichen Konzentrationen an **biv-I** und **mono-II** eine andere Anisotropie des Referenz-Peptids ausgelesen werden kann und sich diese Messmethode zur Diskriminierung zwischen Coiled-Coil-vermittelter Bi- und Monovalenz eignet. Der Kreislauf an „AN“ und „AUS“, wie er in Abb. 65B gezeigt ist, sollte auf Basis dieser Erkenntnisse in der experimentellen Umsetzung wie folgt ablaufen: in entgastem Puffer wurde das Referenz-Peptid **97** in 20 nM Konzentration vorgelegt und die minimale Anisotropie bestimmt (Y_0). Bei Zugabe von 200 nM Syk wurde das Referenz-Peptid gebunden und die maximale Anisotropie gemessen (Y_1). Nun folgte das „Einschalten“ durch Zugabe einer

definieren Konzentration $c_{x\mu\text{M}}$ an bivalentem System **biv-I**. Das Referenz-Peptid sollte proportional zur Konzentration an **biv-I** verdrängt werden und die Anisotropie sinken. Zur Wiederherstellung der Bindung des Referenz-Peptids an Syk, also ein „Ausschalten“ der Bivalenz, wurde Rekonstitutions-Peptid **84** in steigenden Inkrementen hinzugegeben und die Anisotropie verzeichnet. Das Ergebnis für vier verschiedene Konzentrationen $c_{x\mu\text{M}}$ an bivalentem System **biv-I**, nämlich 1 μM , 4 μM , 6 μM und 8 μM , ist in Abb. 67A gezeigt. Eine hohe Konzentration an **biv-I** bewirkt wie erwartet ein proportional größeres Absinken der Anisotropie, da mehr Referenz-peptid verdrängt wird. So beginnt die Rekonstitution von $c_{1\mu\text{M}}$ **biv-I** bei einer normalisierten Anisotropie 0.74, während die Rekonstitution nach Zugabe von $c_{8\mu\text{M}}$ **biv-I** bei 0.30 startet. Ergo sind bei Zugabe von 1 μM **biv-I** etwa drei Viertel des Referenz-Peptids weiterhin gebunden, während in Anwesenheit von 8 μM **biv-I** nur noch ein Drittel des Referenz-Peptids gebunden und zwei Drittel verdrängt wurden. Wird nach Zugabe von 1 μM **biv-I** die Titration von Rekonstitutions-Peptid **84** durchgeführt, so steigt die Anisotropie so lang an, bis ein Äquivalent (1 μM) Rekonstitutions-Peptid in Lösung vorliegt. Die erreichte normalisierte Anisotropie entspricht dabei jener des monovalenten Vergleichssystems **mono-II** (grau). Die Affinität des aufgebrochenen bivalenten Ligandensystems entspricht demnach der Affinität von monovalenten Liganden wie sie bereits verzeichnet wurde (vergl. Abb. 66C). An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die grafische Darstellung im Gegensatz zu Abb. 66 linear und nicht logarithmisch ist und demnach kein sigmoidaler Verlauf erkennbar ist. Ein analoges Verhalten kann beobachtet werden, wenn 4 μM **biv-I** als Startpunkt gewählt werden. Von einer relativen Anisotropie von 0.51 an erfolgt ein Anstieg bei Zugabe von Rekonstitutions-Peptid bis zu einem Äquivalent. Hier wird der Maximalwert erreicht, welcher dem System **mono-II** gleicht. Ebenso verhält es sich für die Verläufe bei den Startkonzentrationen 6 μM und 8 μM . Wird die Titration über ein Äquivalent hinaus fortgesetzt, ist ein kurzes Absinken mit einer anschließenden Stabilisation des Werts zu beobachten. In welcher Form eine weitere Zugabe von Rekonstitutions-Peptid die Bildung multimerer Komplexe induzieren kann, welche die Bivalenz zum Teil wiederherstellen oder die reine Erhöhung der Peptidkonzentration eine Senkung der Anisotropie bewirkt, kann nicht genau gesagt werden. Diese Beobachtung spielt zudem eine untergeordnete Rolle, da einzig der Umstand maßgeblich ist, dass mit einem Äquivalent Rekonstitutions-Peptid ein Maximum in der Höhe von **mono-II** erreicht wird. Um diese Ergebnisse quantitativ besser zu veranschaulichen, wurde eine Darstellung gewählt, in der basierend auf der Anisotropie der Anteil an freiem Referenz-Peptid gezeigt wird (Abb. 67B). Ist das bivalente System **biv-I** gebunden, liegt **97** frei in Lösung vor. Bei Schaltung zur Monovalenz wird **97** zunehmend gebunden und der Anteil an freiem Peptid in Lösung sinkt. Dies wurde für alle Konzentrationen $c_{x\mu\text{M}}$ aufgetragen und mit dem Vergleichssystem **mono-II** in Relation gesetzt. Aus dieser Auftragung geht deutlich hervor, dass durch Zugabe eines Äquivalents an Rekonstitutions-Peptid **84** der vergleichbare „AUS“-Zustand **mono-II** hergestellt werden kann.

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Der blaue und graue Balken stellen dabei den „AN“- und „AUS“-Zustand der Syk-Bindung des bivalenten Systems dar. Zusammenfassend konnte ein Coiled-Coil-basiertes schaltbares System etabliert werden, welches in seiner Bindungsaffinität an das Protein Syk kontrolliert zwischen „AN“, bivalent, und „AUS“, monovalent, geschaltet werden kann.

A) Anisotropieanstieg bei Zugabe von Rekonstitutions-Peptid 84 zum System biv-I (1, 4, 6, 8 μM)



B) Sinkender Anteil an freiem Referenz-Peptid durch Zugabe von Rekonstitutions-Peptid 84

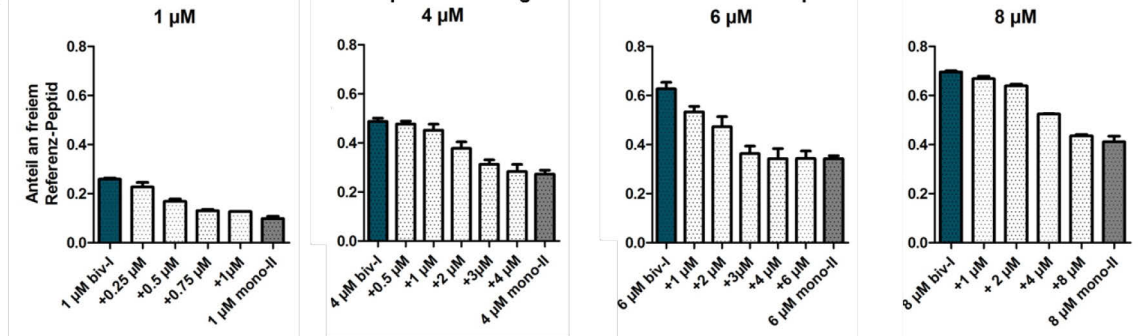


Abb. 67 Schaltung der Syk-Bindung durch das bivalente System **biv-I**. A) Normalisierte Anisotropie mit $Y_0 = 20 \text{ nM}$ Referenz-Peptid **97** und $Y_1 = 20 \text{ nM}$ **97** + 200 nM Syk. Mit Zugabe einer Konzentration $c_{\mu\text{M}}$ an **biv-I** (X_0) wurde Peptid **97** verdrängt. Die Zugabe von Rekonstitutions-Peptid **84** (Auftragung auf der X-Achse) führt zum Aufbrechen des bivalenten Systems (blau). Als Vergleich dient das vorher bestimmte monovalente System **mono-II** (grau). B) Aus der Anisotropie in A bestimmte Anteile an freigesetztem Referenz-Peptid in Bezug zur gesamten Menge an Referenz-Peptid. Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA, 20 nM Referenz-Peptid **97**.

4.5.5) Zusammenfassung von Kapitel 4.5)

In diesem Kapitel wurde ein Coiled-Coil-basiertes System vorgestellt, welches dynamisch zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand variiert werden kann und durch kontrollierte Zugabe eines anderen Peptids reguliert wird.^[311] Kern dieser Regulation ist das Vorhandensein eines Überhangs, welcher nicht nur die Bindung des austauschenden Peptids vermitteln kann, sondern auch durch die erhöhte Stabilität des entstehenden Komplexes den Vorgang thermodynamisch begünstigt. In einem ersten Ansatz zur Schaltung zwischen Fluoreszenz und Löschung wurde mit sukzessiv verlängerten Systemen gearbeitet. Damit konnte eine erste Umsetzung des Konzepts demonstriert werden. Allerdings führten die langen Peptide von bis zu neun Heptaden (63 Aminosäuren) zu einer drastischen Verlangsamung des Austauschs und zeigten auf, dass zu stabile Coiled-Coil-Peptidpaare mit zu geringen

4.5) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zur Bindungsregulation

Dissoziationsraten nicht effektiv verdrängt werden können. In einer veränderten Umsetzung wurde die Strangverdrängung in Form eines Kreislaufs durchgeführt und systematisch auf die Rolle der Überhanglänge untersucht. Dabei wurde die Schaltung nicht mehr durch eine fortwährende Verlängerung des Überhangs, sondern durch die wechselnde Zugabe von Löscher- und Rekonstitutions-Peptid und damit über die Peptidstöchiometrien erreicht. Bereits 0.5 – 1 Heptade Überhang waren ausreichend, um 9 - 11 erkennbare Zyklen zu ermöglichen. Um die Qualität der getesteten System zu vergleich, wurde relative Amplitude, also die Differenz zwischen den beiden Zuständen „AN“ und „AUS“ im Verhältnis zur Startfluoreszenz, ermittelt. Da die Verlängerung um eine Heptade die höchste relative Amplitude bewirkte, wurde dieses System gewählt um ein Modell zur chemischen Regulation eines biologischen Systems zu generieren. Am Beispiel der Syk-Kinase, bestehend aus zwei SH2-Domänen wurde der Wechsel zwischen Bi- und Monovalenz gezeigt. Während ein bivalentes Ligandsystem ein Referenz-Peptid zu verdrängen mag, hat der monovalente Ligand eine geringe Affinität zum Protein. In einem Fluoreszenzanisotropie-Assay konnte gezeigt werden, dass ein „AN“-geschaltetes System **biv-I**, welches den Proteinliganden bivalent präsentiert, durch Zugabe von Rekonstitutions-Peptid in einen „AUS“-Zustand geschaltet werden und die Fähigkeit zur Bindung verliert. Insgesamt, wurden auf Basis von Coiled-Coil-Peptiden Module erzeugt, die ähnlich DNA-basierten schaltbaren Systemen das Auslesen eines „*output*“ bei Eingabe einer Information „*input*“ ermöglichen. Durch die strukturelle Verwandtschaft zwischen Peptiden und Proteinen sind diese Systeme wesentlich einfacher in proteinbiologischen Fragestellungen anzuwenden und ermöglichen die gezielte Regulation eines Prozesses wie Bindungsverhalten.

SEKTION III

-

PNA-SYSTEME

UND DIE GRENZEN DES TEMPLATEFFEKTS

In der vorhergehenden Sektion wurden Coiled-Coil-Peptide in einer statischen und einer dynamischen Anwendung genutzt. Erstere wurde genutzt, um gezielt eine orthogonale Markierung zu erzeugen, während zweitere eine dynamische Schaltbarkeit zwischen zwei Zuständen erlaubte. Analog sollen nun Anwendungsvarianten von PNA in dynamischer und statischer Weise demonstriert werden.

Der erste Abschnitt 4.6 beschreibt das Konzept der PNA-Strangverdrängung. Ein installierter PNA-tag soll in einer dynamischen Anwendung derart genutzt werden, dass zunächst ein Fluorophor-DNA-Strang rekrutiert und nachfolgend durch einen verlängerten Verdrängungsstrang wieder entfernt wird.

Im darauf folgenden Abschnitt 4.7 wird die Synthese von PNA-Protein-Konjugaten vorgestellt, um die Proteine EGF und TGF α an einem DNA-Templat zu präsentieren. Damit soll ein modulares System geschaffen werden, in welchem die Proteine in verschiedenen Zusammensetzungen und Abständen dem membranständigen Rezeptor EGFR zur Bindung angeboten werden können. Es wird eine vollsynthetische Route über NCL beschrieben, die die entsprechenden Konjugate liefert.

In 4.8 wird ein Konzept dargestellt, welches die intrazelluläre Markierung von Proteinen ermöglichen soll. Dabei soll erneut Gebrauch von einer NCL-artigen Transferreaktion gemacht werden, in der der Fluorophor TMR übertragen werden soll. Allerdings soll das Templatsystem ein neuartiges Peptidpaar aus CPP (*cell-penetrating peptide*) und einem CPP-bindenden Peptid sein.

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

4.6.1) Die PNA-Strangverdrängung

4.6.1.1) Konzept der PNA-Strangverdrängung

Die Markierung des EGFR und zweier GPCRs unter Verwendung des PNA-tags wurde in Kapitel 4.2 vorgestellt. In einer weiterführenden Untersuchung wurde zudem gezeigt, dass eine verbrückende DNA die Aktivierung und Internalisierung der Rezeptoren bewirkt. Wenn parallel mehrere Fluorophore installiert werden sollen, so ist auch das durch die Multi-Markierung über eine Konnektor-DNA möglich. Ist es allerdings auch möglich neben einer parallelen, eine sequenzielle Art der Markierung zu erlauben? Mit anderen Worten: kann der PNA-tag genutzt werden, um nach einmaliger Markierung mit einer DNA(1) wieder freigelegt zu werden und für eine zweite Adressierung durch eine DNA(2) zugänglich zu sein? Dies könnte beispielsweise interessant sein, wenn in einer ersten Markierung allein das Vorhandensein des Rezeptors getestet werden soll und erst im zweiten Schritt wahlweise ein Effekt, z.B. die Dimerisierung, stattfinden soll. Auch könnten so verschiedene Populationen an Rezeptoren unterschieden werden, wenn etwa nach einer Stimulation nicht internalisierte Rezeptoren wieder von der Markierung befreit und in einer anderen Farbe sichtbar gemacht werden sollen.

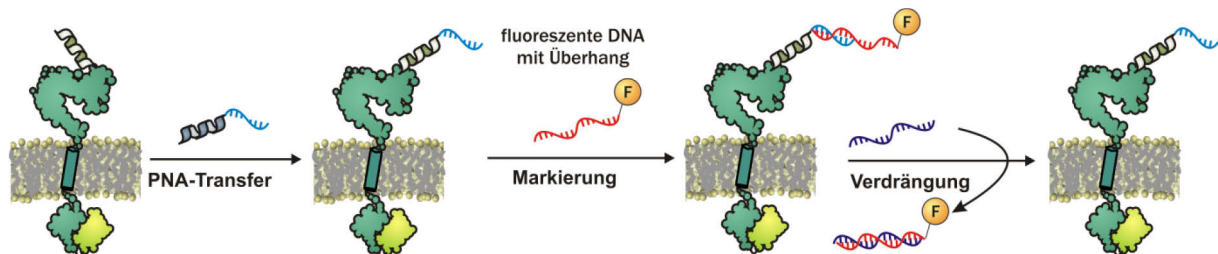


Abb. 68 Konzept der PNA-Strangverdrängung. Der PNA-tag wird mit einem DNA-Oligonukleotid markiert, welches eine zusätzliche, nicht-komplementäre Sequenz enthält. Eine entsprechend verlängerte PNA kann dann genutzt werden, um den PNA-tag von der Markierung zu befreien.

Es wäre nun denkbar, den ersten DNA-Strang durch einen Überschuss eines zweiten auszutauschen (statistisch). Allerdings ist anzunehmen, dass für die verwendeten PNA-DNA-Längen die Dissoziationsraten zu gering sind, als dass es zu einer schnellen und effizienten Verdrängung kommen sollte. Ein Überhang, der bereits im ersten DNA-Strang integriert wäre, könnte eine Strangverdrängung erleichtern. Ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen DNA-DNA-Strangverdrängung sollte dieser Überhang als Initiator eines Verdrängungsprozesses dienen und zudem ein Produkt mit höherer thermodynamischer Stabilität erzeugen.

4.6.1.2) Zeitabhängige Untersuchungen der Strangverdrängung

Für DNA-basierte Systeme sind Parameter, die die Geschwindigkeit und das Gleichgewicht des Verdrängungsvorgangs beeinflussen, gut untersucht.^[300] Ein Überhang von wenigen Nukleotiden Länge ist bereits ausreichend, um den Keim für die „*branch migration*“, also den Austausch eines Stranges gegen den anderen am Templatstrang entlang, zu setzen. Ab einer Länge von sechs Nukleotiden erfolgt keine weitere Beschleunigung des Verdrängungsprozesses.^[223] Für PNA-basierte Systeme liegen derartige Erkenntnisse nicht vor. Die PNA verfügt neben der hohen thermischen und biologischen Stabilität in PNA-PNA- und PNA-DNA-Doppelsträngen über interessante Eigenschaften in Bezug auf ihr Bindungsverhalten an DNA-Strängen. PNA-Oligomere können in DNA-Doppelstränge eindringen und somit einen DNA-Strang aus dem Duplex verdrängen.^[312, 313] Dies führt zur Bildung so genannter P-Loops. Inwiefern ein PNA-Oligomer in der Lage ist ein anderes, kürzeres PNA-Oligomer zu verdrängen, wie es für das vorgestellte Konzept notwendig wäre, wird nachfolgend untersucht.

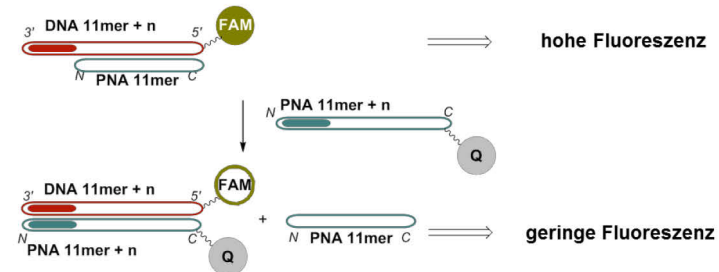
Der Fluoreszenz-Assay

Im Vordergrund stand zu Beginn also die experimentelle Untersuchung des Verdrängungsprozesses mit den Kernfragen: i) wie lang muss der Überhang gewählt? ii) wie schnell läuft der Prozess ab? iii) sind 11mer- und 16mer-PNA gleichermaßen anwendbar, oder sind die Dissoziationsraten solcher Doppelstränge zu gering, um einen Austausch zu ermöglichen? Es wurde ein Assay entwickelt, in welchem der Prozess der Verdrängung anhand von Fluoreszenzänderung beobachtet wurde. Wie in Abb. 69A dargestellt, wurde dafür eine FAM-markierte DNA mit Überhang in Puffer vorgelegt. Der komplementäre PNA-Strang, dessen Sequenz der PNA im jeweiligen Donor entspricht, wurde durch Erhitzen und langsames Abkühlen hybridisiert. Wurde nun eine Löscher-tragende Verdrängungs-PNA in einem Äquivalent hinzugegeben, so sollte die Verdrängung des ursprünglichen PNA-Strangs durch ein Absinken der Fluoreszenz von FAM zu verzeichnen sein. Wieder wurde Dabcyl als Löscher gewählt. Für den Assay wurde eine Konzentration an 0.5 µM FAM-DNA in entgastem DNA-Puffer verwendet, da hierbei ein ausreichendes Signal von ca. 350 - 400 Einheiten erzeugt werden konnte (Vorabexperimente siehe Kapitel 7.3.5). Wurde FAM-DNA **99** direkt mit der Löscher-PNA **100** hybridisiert, so sank die Fluoreszenz am Emissionsmaximum auf ca. 130 Einheiten. Wurde FAM-DNA **99** zunächst mit PNA **98** hybridisiert und dann Löscher-PNA **100** hinzugegeben, so stellte sich ein ähnlicher Wert von 138 Einheiten nach 30 min ein. Die Fluoreszenz sank nicht weiter, wenn erneut erhitzt und abgekühlt wurde. Es wird deutlich, dass das Fluoreszenzintensitätsminimum in An- und Abwesenheit von PNA **98** in beiden Fällen bei ca. 130 Einheiten liegt. Die Verdrängung scheint demnach auch in Anwesenheit von PNA **98**

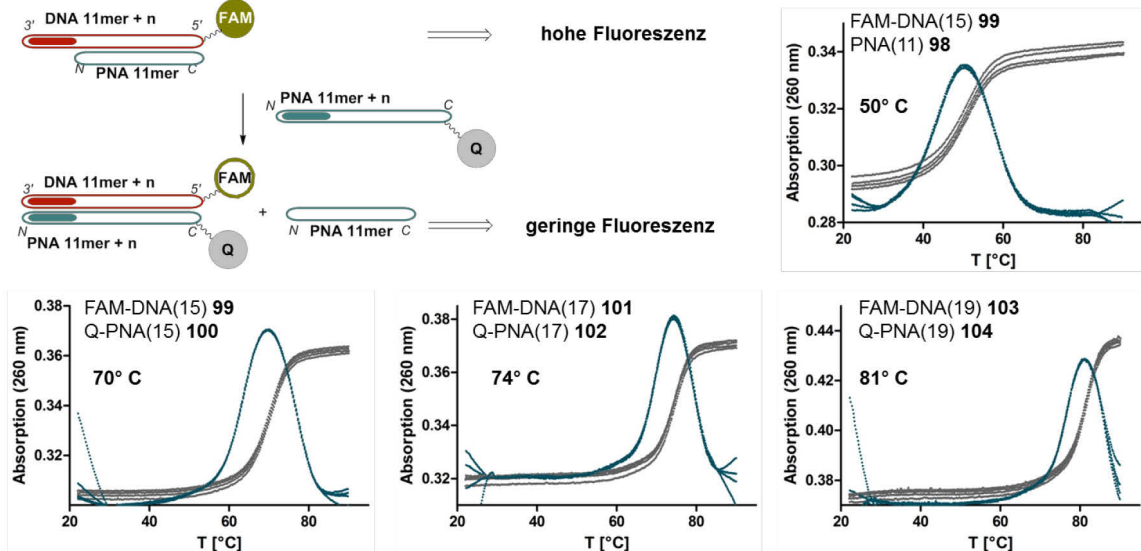
4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

vollständig abzulaufen. Aus diesem Grund wurde es für legitim befunden für die Darstellung der Kinetik die gemessene Fluoreszenz mit $F_{\text{MAX}} = 1$ und $F_{\text{MIN}} = 0$ zu normieren, um leichte Schwankungen in der Start-Fluoreszenz zu korrigieren.

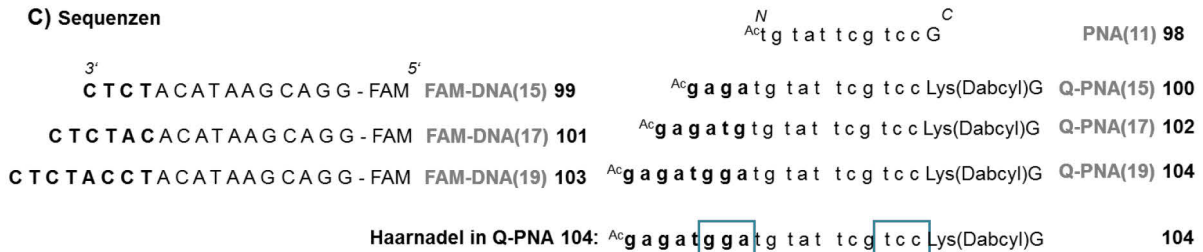
A) Fluoreszenz-Assay



B) Schmelztemperatur-Bestimmung



C) Sequenzen



D) Verdrängung der 11mer-PNA im Fluoreszenz-Assay

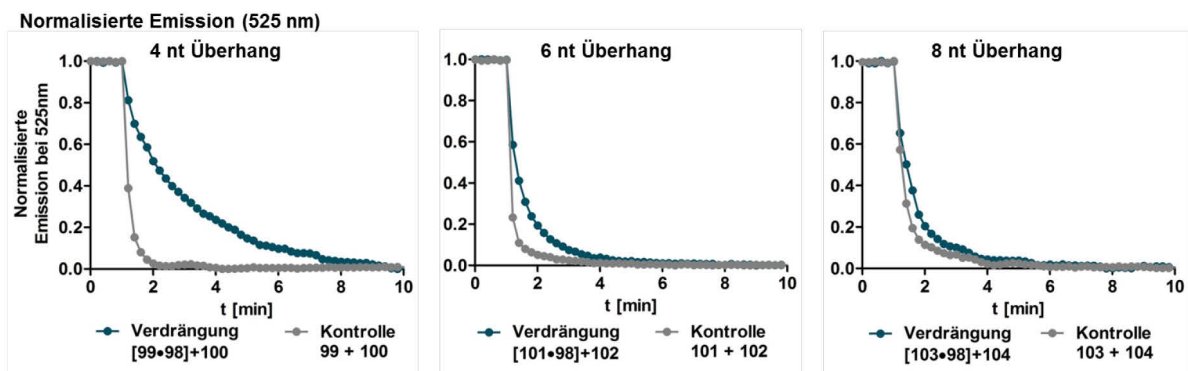


Abb. 69 Experimentelle Untersuchungen zur PNA-Strangverdrängung an einem 11mer-Oligomer. A) Funktionsweise des Fluoreszenz-Assays: die Verdrängung von PNA(11) durch PNA(11+n) wird durch ein Absinken der Fluoreszenz deutlich, da FAM und Dabcyl in Nähe gebracht werden. B) Thermische Denaturierungsexperimente und daraus abgeleitete Schmelztemperaturen T_M . C) Sequenzen der verwendeten FAM-DNA / Löscher-PNA-Paare mit 4, 6 oder 8 Nukleotiden Überhang (fett). Q-PNA 104 verfügt über selbstkomplementäre 3mer-Abschnitte (blau), die zu einer Haarnadelstruktur führen könnten. D) Kinetische Experimente zur Verdrängung. Das Löschen der FAM-spezifischen Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ in entgastem DNA-Puffer bei 37°C mit einer Messfrequenz von 12 s aufgezeichnet.

Untersuchungen am 11mer-Oligomer

Der beschriebene Fluoreszenz-Assay wurde zunächst am 11mer-Oligomer PNA **98**, welches durch Donor **30** übertragen wird, untersucht. Drei verschiedene Längen an Überhang wurden in Anlehnung an Vorkenntnisse aus rein DNA-basierten Systemen gewählt: vier, sechs und acht Nukleotide (Abb. 69C). Eingangs wurden die thermischen Stabilitäten der jeweils resultierenden PNA·DNA-Doppelstränge gemessen, um einen Eindruck über den thermodynamischen Vorteil zu gewinnen, der durch die Verdrängung entstehen würde (ergänzende PAGE-Analyse in Kapitel 7.3.3). Bereits vier Nukleotide Überhang ergaben einen Duplex dessen Schmelztemperatur 20 °C höher war, als die Schmelztemperatur des Ausgangs-Duplex (50 °C, Abb. 69B). Der Assay wurde für jedes FAM-DNA / Löscher-PNA-Paar in zwei Varianten durchgeführt: zum einen wurde die FAM-DNA eingangs mit PNA **98** hybridisiert, die Fluoreszenz gemessen und nach 1 min die entsprechende Löscher-PNA hinzugegeben. Zum anderen wurde als Kontrolle allein FAM-DNA vorgelegt und nach 1 min Löscher-PNA hinzugegeben. Dies sollte zeigen, inwieweit der Überhang einen kinetischen Vorteil im Verdrängungsprozess bewirkt. Abb. 69D fasst die Ergebnisse für alle drei Überhänge zusammen. Wurde PNA **98** nicht hinzugegeben, so war der reine Hybridisierungsprozess in 1 – 3 min abgeschlossen (grau). Die Verdrängung erforderte in allen drei Fällen mehr Zeit (blau). Dabei wurde der Unterschied zwischen dem Verdrängungs-experiment und der Kontrollmessung immer geringer, je länger der Überhang war. Zwischen sechs und acht Nukleotiden war kein großer Unterschied mehr zu erkennen, da beide eine Verdrängung innerhalb von ca. 3 min ermöglichten. Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass dieser geringfügige Unterschied der Wahl der Überhangsequenz geschuldet sein könnte. Es stellte sich heraus, dass die verwendete 8mer-Sequenz in Kombination mit der Stammsequenz PNA(11) zur Bildung einer Haarnadelstruktur in FAM-DNA **103** bzw. Q-PNA **104** führte (Abb. 69C). Damit erklärt sich auch die langsamere Hybridisierung mit 8 nt Überhang im Vergleich zu 6 nt Überhang (grau). Ungeachtet dessen lässt sich zusammenfassen, dass sechs Nukleotide Überhang ausreichend sind, um in wenigen Minuten eine Strangverdrängung zu bewirken. Da in der Anwendung an GPCRs die Stabilität der 11mer-PNA·DNA-Interaktion als nicht ausreichend erachtet wurde und die Strangverdrängung derart reibungslos am 11mer-System erfolgt, wurde das System ebenfalls auf den 16mer-tag übertragen.

Untersuchungen am 16mer-tag

Zur Untersuchung wurde das PNA-Oligomer **105** in Anlehnung an jene Sequenz, die durch Donor **35** übertragen wird, hergestellt. Es wurde keine weitere Optimierung des Überhangs vorgenommen, sondern die 6mer-Sequenz aus den vorhergehenden Versuchen angewandt (Abb. 70A). In der Untersuchung der Schmelztemperaturen der resultierenden Doppelstränge zeigte sich, dass bereits der Duplex zwischen 16mer-PNA **107** und verlängerter FAM-DNA **106** mit T_M

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

= 66 °C sehr stabil ist (Abb. 70B). Der Stabilitätsgewinn durch den Austausch der 16mer- gegen eine komplett komplementäre 22mer-PNA **107** oder **108** führte damit zu einem geringeren thermodynamischen Zugewinn (11 °C), als es für die 11mer-PNA der Fall war (20 °C). Wurden das Verdrängungs- (blau) und Kontrollexperiment (grau) auf analoge Weise im Fluoreszenz-Assay durchgeführt, so konnte kein wesentlicher Unterschied im zeitlichen Verlauf beobachtet werden (Abb. 70C, links). Zwar erschien die Verdrängung mit Überhang zunächst fast gleichschnell, wie die Hybridisierung, doch konnte bei näherer Betrachtung der nicht normierten Fluoreszenz ein stärkeres Absinken des Signals gemessen werden, wenn keine PNA **98** zu verdrängen war (Abb. 70C, Mitte, grau vs. blau). Wurde FAM-DNA(22) **106** zunächst mit der vollständig komplementären Sequenz PNA(22) **108** hybridisiert (Abb. 70C Mitte, grün), so zeigte das Fluoreszenzsignal zwar wieder eine rasche Abnahme, doch konnte nach 9 min eine noch geringere Fluoreszenzlöschung (höheres Signal) beobachtet werden, als für den Verdrängungsvorgang mit Überhang. In allen Fällen verläuft die Fluoreszenzlöschung in verschiedenem Maße unvollständig. Da die Prozesse bei 37 °C beobachtet wurden und kein zwischenzeitliches Erhitzen und Abkühlen der Lösung vorgenommen wurde, wurden vorhandene Sekundärstruk-

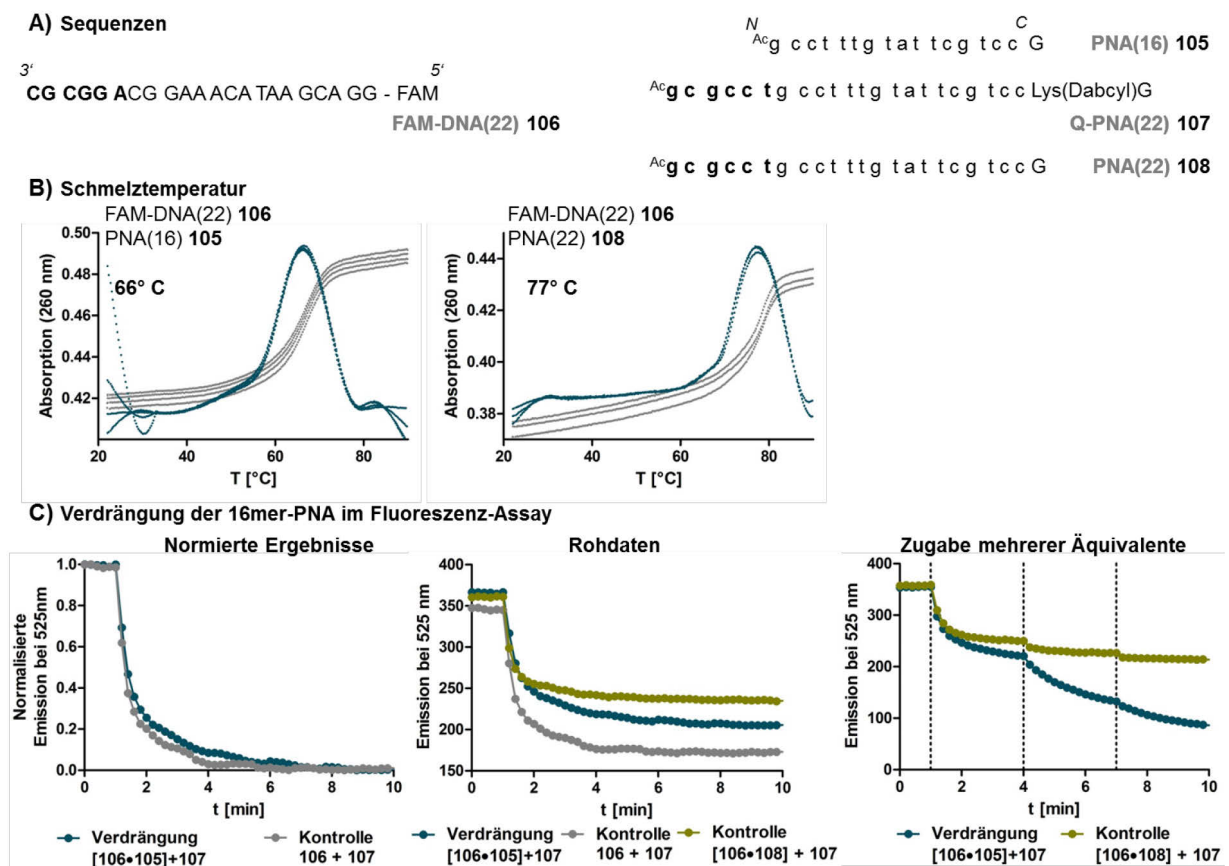


Abb. 70 Experimentelle Untersuchungen zur PNA-Strangverdrängung an einem 16mer-Oligomer. A) Sequenzen der Testverbindungen: PNA **85** entspricht der Sequenz, die durch Donor **35** übertragen wird. B) Thermische Denaturierungsexperimente und daraus abgeleitete Schmelztemperaturen T_M . C) Kinetische Experimente zur Verdrängung: normierte Werte (links) und Rohdaten (Mitte) im Vergleich. In einem weiteren Versuch wurde alle 3 min ein weiteres Äquivalent Verdrängungs-PNA **87** zum Komplex [86•85] bzw. [86•88] hinzugegeben. Das Löschen der FAM-spezifischen Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{ex} = 485$ nm und $\lambda_{em} = 525$ nm in entgastem Puffer bei 37 °C mit einer Messfrequenz von 12 s aufgezeichnet.

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

turen der zugegebenen Löscher-PNA **107** nicht aufgebrochen. Aus diesen Experimenten geht hervor, dass für die gewählten Sequenzen der Überhang allein nicht ausschlaggebend für die Geschwindigkeit der Verdrängung zu sein scheint. Dies ist unerwartet in Hinblick auf die Kenntnisse über DNA-basierte Systeme. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten könnten mechanistische Unterschiede zwischen PNA- und DNA-basierten Verdrängungsprozessen sein. Während letztere durch den Vorgang der *branch migration* in dem Überhang einen Startpunkt für die Verdrängung entlang der Sequenz finden, verlaufen PNA-basierte Prozesse über Strang-invasion. Der Überhang bewirkt somit nur in geringem Maße eine kinetische Beschleunigung und erzeugt in erster Linie einen stabileren Duplex als Ausgabe. In der Folge ist der Anteil an **106·107** am höchsten, wenn kein Strang vorab hybridisiert wurde (grau), etwas geringer, wenn der vorab hybridisierte Strang **105** kürzer ist (blau) und bei ca. 50%, wenn der zu verdrängende und der zugegebene Strang gleichlang sind (grün). Der Vorteil des Überhangs wird deutlich, wenn nun mehrere Äquivalente an Q-PNA(22) **107** hinzugegeben werden. Wurde vorab PNA(22) **108** an FAM-DNA(22) **106** hybridisiert, so ergaben selbst drei Äquivalente an PNA(22) **107** keine Fluoreszenzlöschung von unter 200 Einheiten. Wurde Q-PNA(22) **107** zum Komplex **106·105** hinzugegeben, führte jedes weitere Äquivalent zu einer drastischen Löschung.

Der Zusammenhang zwischen dem Zugewinn an Duplexstabilität durch Sequenzverlängerung und der Effizienz der Fluoreszenzlöschung ist in Abb. 71 zusammengefasst. Für die getesteten Komplexe, in denen jeweils PNA **98** (Spalten 1 – 3), **105** (Spalte 4) oder als Kontrolle **108** (Spalte 5) verdrängt werden sollte, wurde die relative Löschung in der Art bestimmt, dass die Fluoreszenzabnahme bei Verdrängung ins Verhältnis gesetzt wurde zur reinen Hybridisierungsfluoreszenz (Kontrolle) der jeweiligen FAM- und Dabcyl-Stränge ohne PNA **98**, **105** oder **108**. Die Fluoreszenz des Komplexes **99·98** wird durch Zugabe von Q-PNA **100** im selben Maß gelöscht, wie bei freier FAM-DNA **99** (99.6%). Dabei war der neu gebildete Duplex **99·100** um 20 °C stabiler, als der Ausgangsduplex. Ähnliches gilt für die Verdrängung von PNA **98** aus dem Komplex mit FAM-DNA **101** (102%, $\Delta T_M = 24$ °C). Bei einem $\Delta T_M = 11$ °C oder 0 °C hingegen gelang die Verdrängung des PNA-Strangs nicht vollständig (Spalten 4 und 5). Einen Sonderfall stellt die Verdrängung von PNA **98** aus dem **98·103-Duplex** durch Löscher-PNA **104** dar, da trotz eines $\Delta T_M = 31$ °C nur zu 82% relative Löschung erreicht werden (Spalte 3). Dies wird auf unerwünschte Haarnadelstrukturen zurückgeführt. Die Schmelztemperaturdifferenz zwischen Duplex **106·105** und **106·107** (Spalte 4) liegt mit $\Delta T_M = 11$ °C vergleichsweise niedrig. Hier wird eine relative Löschung von nur 93% erreicht. Die Löschung, die durch Zugabe von **107** zum Komplex **106·108** ohne Überhang erzielt wird, ist im Gegensatz dazu vergleichsweise hoch. Es soll betont werden, dass die Anteile in Bezug auf die Kontrollmessungen gesetzt sind und nicht die absoluten Anteile an verdrängten Strängen widerspiegeln.

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

Für die Anwendung an lebenden Zellen wurde geschlussfolgert, dass eine Überhangsequenz in der Markierungs-DNA insbesondere bei mehrfacher Anwendung der Verdrängungs-PNA von Vorteil sein könnte.

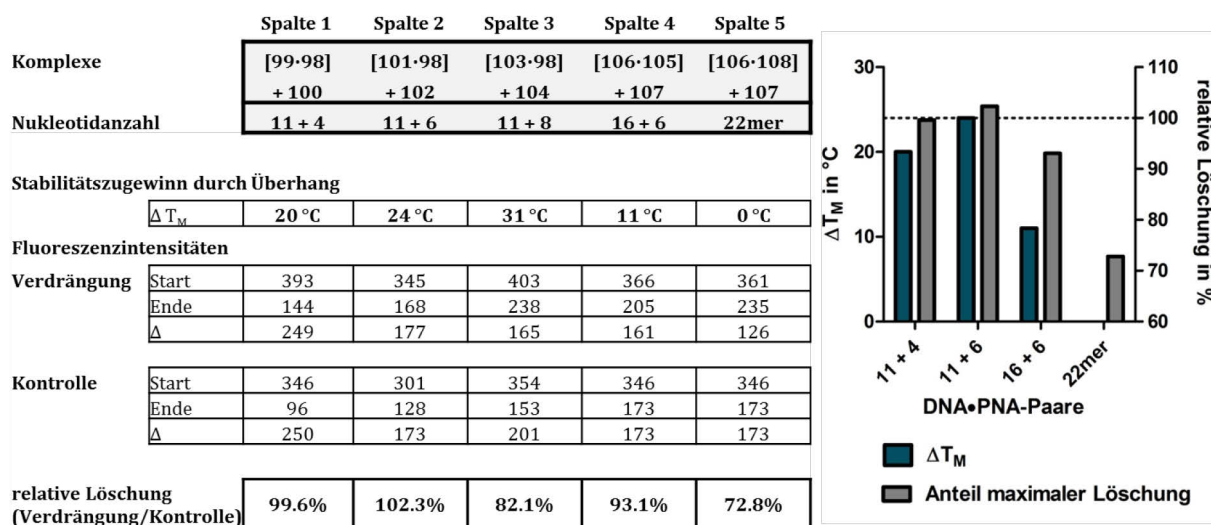


Abb. 71 Vergleich zwischen Duplexstabilitäten und Löschungseffizienz. Letztere wurde bestimmt, indem die Differenz aus Start- und Endwert der Fluoreszenzintensität im Assay ermittelt wurde. Die erzielte Differenz im Verdrängungsexperiment wurde in Relation zum Kontrollexperiment ohne Q-PNA gesetzt.

4.6.2) Schaltbarkeit des PNA-tags an einem GPCR

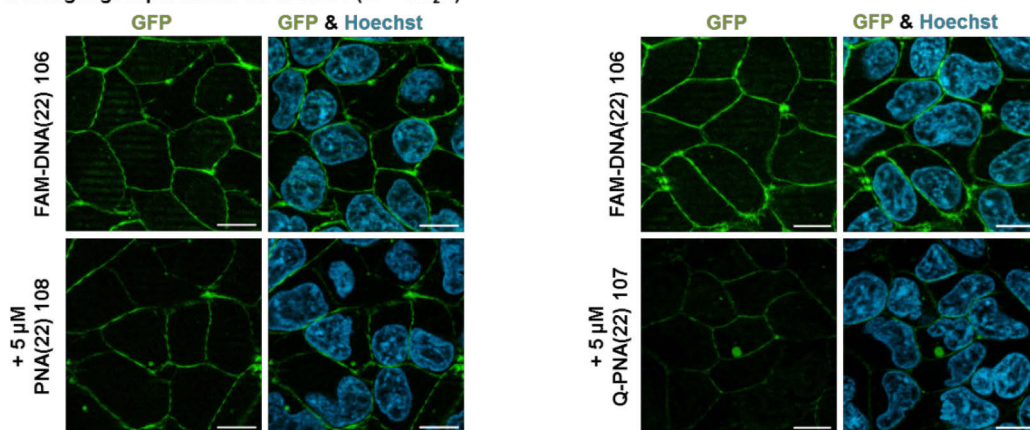
Erste Experimente, in denen ein installierter PNA-tag durch DNA markiert und durch Verdrängungs-PNA wieder befreit werden sollte, wurden an dem stabil in HEK293-Zellen exprimierten hY₂-Rezeptor durchgeführt. Diese Experimente wurden von Dr. Jonathan Lotze in der Arbeitsgruppe von Prof. A.G. Beck-Sicking (Universität Leipzig) durchgeführt.^[273] Der Rezeptor wurde wie in Kapitel 4.2. beschrieben durch den Donor **35** mit der PNA-Sequenz **105** versehen und anschließend mit der FAM-DNA(22) **106** markiert (Abb. 72A). Auch bei 37 °C blieb die Markierung stabil. Wurden die Zellen nun mit 5 µM Verdrängungs-PNA **108** über 5 min inkubiert und gewaschen, wurde die Fluoreszenzintensität im FAM-Kanal nur geringfügig gemindert (Abb. 72A links). Interessanterweise zeigte sich, dass die Anwendung von Löscher-markierter PNA **107** anstelle von PNA **108** unter den gleichen Bedingungen zu einer stärkeren Verminderung der Fluoreszenzintensität im FAM-Kanal führte. Zwei mögliche Erklärungen sollen hier betrachtet werden.

Zum einen ist es denkbar, dass die Verdrängungs-PNA **108** nicht verdrängt, sondern zusätzlich gebunden wird und der in räumliche Nähe gebrachte Löscher die Fluoreszenzabsenkung bewirkt. Hier wird eine Schwäche des vorgestellten Fluoreszenz-Assays deutlich: das Absenken des Fluoreszenzsignals der FAM-Markierung bedeutet zwar eine räumliche Annäherung des Löschers, gibt jedoch keine Auskunft darüber, ob der zuvor gebundene Strang verdrängt wird, oder weiterhin gebunden bleibt. Die Bildung von Triplex-Strukturen der Form PNA₂·DNA ist vor

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

allem für Pyrimidin-reiche PNA-Sequenzen bekannt und kann je nach Bedingungen zu Triplexstrukturen mit hoher Stabilität führen.^[312] Nun weisen die hier verwendeten PNA-Sequenzen mit 75% (PNA(16)) und 73% (PNA(22)) und mit bis zu fünf aufeinander folgenden C- bzw. T-Monomeren relativ hohe Anteile an Pyrimidinen auf. So wurde im Denaturierungsexperiment überprüft, ob Anzeichen einer Triplexbildung zu beobachten sind (Abb. 72B). Wurden die Experimente mit zwei Äquivalenten PNA(22) **108** und einem Äquivalent FAM-DNA(22) **106** durchgeführt, so indiziert zwar eine leichte Schulter zwischen 65 – 70 °C die Ausbildung einer weiteren Struktur, allerdings ist sie sehr schwach ausgeprägt und so erscheint eine Triplexbildung recht unwahrscheinlich. Die thermische Denaturierung von Strukturen, die sich aus der Kombination von FAM-DNA(22) **106** und je einem Äquivalent PNA(16) **105** und PNA(22) **108** weist erwartungsgemäß zwei definierte Wendepunkte bei 66 °C und 79 °C auf. Damit wird deutlich, dass wie bereits vermutet die Komplexe **106·105** und **106·108** nebeneinander vorliegen. Allerdings kann keine Aussage über weitere Strukturen getroffen werden.

A) Verdrängungsexperimente an HEK293 ($\Delta^{C-E3}hY_2R$)



B) Verdrängungsexperimente an HEK293 ($\Delta^{C-E3}hY_2R$)

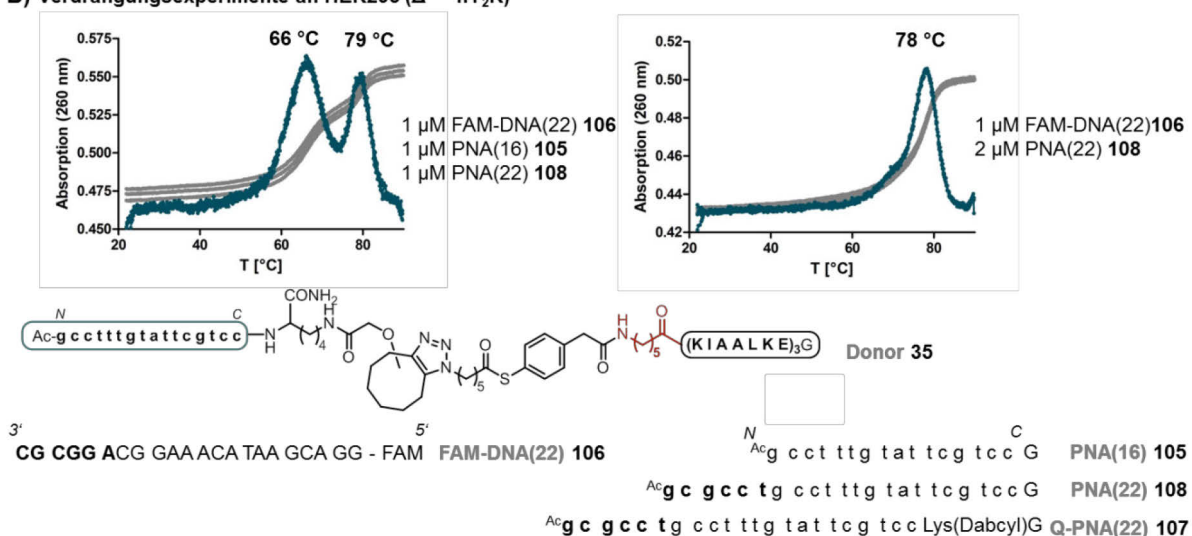


Abb. 72 Verdrängungsexperimente am hY_2R . A) HEK293($\Delta^{C-E3}hY_2R$)-Zellen (Zellkerne in blau) wurden mit Donor **35** behandelt, mit DNA **106** markiert und gewaschen (grün, obere Reihe). PNA **108** oder **107** wurde für 5 min hinzugegeben und die Zellen erneut gewaschen (untere Reihe). Skala – 10 μ m. B) Denaturierungsexperimente zu FAM-DNA **106** in Anwesenheit von zwei Äquivalenten komplementärer PNA.

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

Eine andere Erklärung für die vergleichsweise geringe Abnahme der FAM-Fluoreszenzintensität könnte eine unspezifische Interaktion zwischen dem abgelösten PNA·DNA-Komplex **106·108** und der Zelloberfläche sein. Besonders lange PNA-Oligomere neigen stark zu derartigem Verhalten (vergleiche Kapitel 4.2). Die Versuche sollten am EGFR erneut durchgeführt und quantitativ ausgewertet werden. Es wurde angenommen, dass die freigelegten PNA-Stränge für eine weitere Anwendung zugänglich sein sollten.

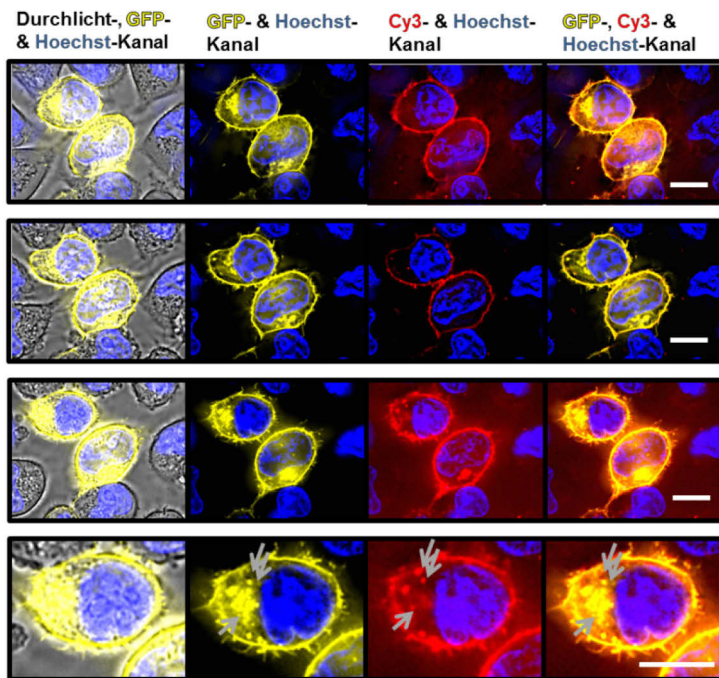
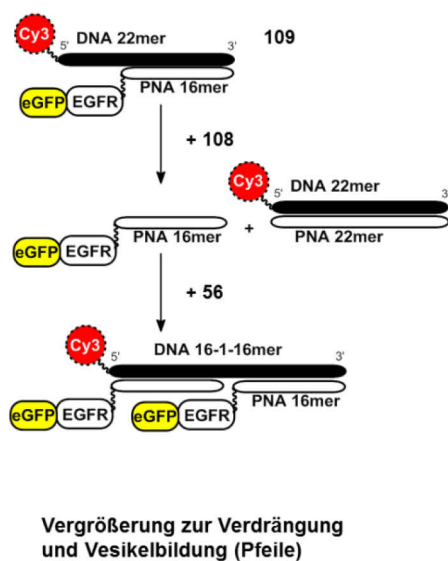
4.6.3) Schaltbarkeit des PNA-tags am EGFR

Analog zu dem Vorgehen in Kapitel 4.2 wurden HEK293-Zellen transient mit dem C-E3-EGFR-eGFP-Vektor transfiziert und die 16mer-PNA-Sequenz durch Donor **35** selektiv an dem modifizierten EGFR installiert. Wie zuvor erfolgte die Mikroskopie am IX83 von *Olympus* unter Aufnahme von hintergrundkorrigierten Z-Stapeln. Zur Visualisierung des EGFR-eGFP konnte die bisher verwendete FAM-DNA(22) **106** nicht genutzt werden, da FAM und GFP im gleichen Kanal angeregt und ausgelesen werden. Statt FAM wurde der Farbstoff Cy3 in DNA **109** verwendet. Die erfolgreiche und selektive Markierung ist im Cy3-Kanal und in der Signalüberlappung mit dem GFP-Signal zu erkennen (Abb. 73A, obere Reihe). Das Vorgehen zur Ablösung von DNA **109** durch PNA **108** wurde wie folgt abgeändert: statt einer einmaligen Zugabe von 5 µM PNA **108** wurden die Zellen für je 2 min mit 1 µM PNA **108** inkubiert und anschließend gewaschen. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt und die Zellen erneut betrachtet. Um die Effizienz der Verdrängung evaluieren zu können, wurde der Quotient aus Cy3/GFP vor und nach der Behandlung ermittelt und verglichen. Hierfür wurde von zehn willkürlich gewählten Punkten entlang der Membran markierter Zellen die durchschnittliche Cy3- und GFP-Intensität vor Durchführung der Wiener-Dekonvolution ermittelt. Dabei wurden jeweils dieselben zehn Punkte vor und nach der Zugabe von PNA **108** verwendet (näheres siehe Kapitel 7.3.2.2). Die Intensität des Cy3-Signals wurde somit auf das in diesen Zeiträumen konstante GFP-Signal normiert. Es zeigte sich, dass nur noch 76% der Cy3-Intensität zu verzeichnen waren, wenn Cy3-DNA **109** durch PNA **108** verdrängt wurde. Im Gegensatz dazu blieb die Cy3-Intensität im Kontrollexperiment unverändert, wenn die Markierungs-DNA **47**, welche keinen Überhang enthält, verwendet wurde (Abb. 73B). Die gebildete PNA·DNA-Interaktion wird also nicht gebrochen, wenn kein Stabilitätszugewinn durch eine längere komplementäre Sequenz gegeben ist. Der Überhang hat demnach nicht die Wirkung, eine vollständige Fluoreszenzlöschung zu erzeugen, doch zeigt dieses Ergebnis, dass ohne Überhang keinerlei Verdrängung stattfinden würde. Wiederum kann an dieser Stelle nicht unterschieden werden, ob die Verdrängung unvollständig verläuft, oder der abgelöste PNA·DNA-Komplex **106·108** mit der Zelloberfläche wechselwirkt. Letztere könnte durch Anpassung der Pufferbedingungen optimiert werden.^[244]

4.6) Schaltbarkeit des PNA-tags

Nachdem somit ca. ein Viertel der installierten PNA-tags freigelegt wurde, wurde deren Anwendung in einem zweiten Schritt demonstriert. Hierfür wurde die verbrückende DNA **56** in 200 nM Konzentration hinzugegeben und die Zellen, ohne weitere Stimulation mit EGF, für 5 min bei 37 °C gehalten. Bei erneuter Betrachtung zeigte sich die Bildung von EGFR-haltigen Vesikeln im GFP- und Cy3-Kanal (Abb. 73A, untere Reihe). Die Internalisierung von EGF-Rezeptoren findet demnach statt und demonstriert, dass der Anteil an freigelegten PNA-tags zur gezielten Dimerisierung genutzt werden kann.

A) Verdrängungsexperimente am EGFR



B) Kontrolle

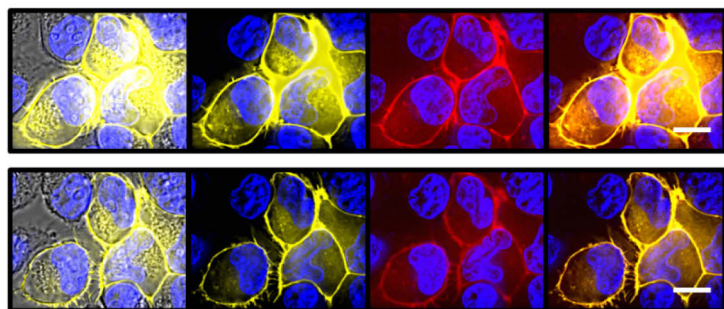
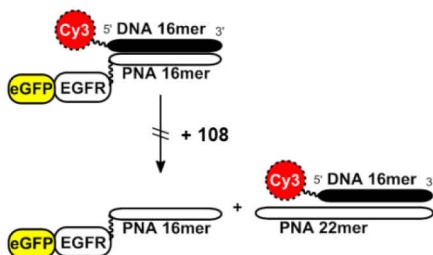


Abb. 73 Verdrängungsexperimente am EGFR: Durchlicht, GFP & Hoechst (links), GFP & Hoechst (mittig links), Cy3 & Hoechst (mittig rechts), Überlagerung GFP / Cy3 & Hoechst (rechts). A) Transient transfizierte Zellen (GFP) wurden durch Donor **35** mit der 16mer PNA-Sequenz verknüpft und mit der Cy3-DNA(22) **109** mit 6mer-Überhang markiert (Cy3-Kanal, obere Reihe). Die Zellen wurden drei Mal für je 2 min mit je 1 μ M PNA(22) **108** behandelt (mittlere Reihe). Verbrückende DNA **56** wurde hinzugegeben und die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Vesikel sind durch graue Pfeile in der Vergrößerung hervorgehoben. B) Als Kontrolle wurden transient transfizierte Zellen mit PNA-verknüpften EGF-Rezeptoren mit Cy3-DNA **47** ohne Überhang markiert (obere Reihe). Die Zellen wurden drei Mal für je 2 min mit je 1 μ M PNA(22) **108** behandelt (untere Reihe). Skala – 10 μ m.

4.6.4) Zusammenfassung von Kapitel 4.6)

In diesem Abschnitt wurde die Strangverdrängung an PNA-DNA-Doppelsträngen in einem Fluoreszenz-Assay untersucht. Dabei wurde zunächst die Verdrängung eines 11mer-, dann eines 16mer-PNA-Strangs aus einem PNA-DNA-Duplex mit verlängertem, fluoreszenten DNA-Strang betrachtet, indem ein zum verlängerten DNA-Strang komplementäres Löscher-PNA-Oligomer hinzugegeben wurde. Wurde für die Verdrängung einer 11mer-Sequenz ein um sechs Nukleotide verlängertes System gewählt, so schien die Verdrängung schneller zu verlaufen, als wenn der Überhang eine Länge von nur vier Nukleotiden besitzt. Bei der Untersuchung der Verdrängung aus einem PNA-DNA(22)-Komplex durch Zugabe von Löscher-PNA(22) **107** wurde beobachtet, dass es in den betrachteten Zeiträumen kaum deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit der Verdrängung gab, wenn eine kurze 16mer- (**105**) oder eine gleichlange 22mer-PNA-Sequenz (**108**) im Komplex vorlag. Auch die Kontrolle ohne Verdrängung zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Allerdings waren die jeweiligen Anteile der verdrängten PNA-Oligomere abhängig vom System. Dies deutet darauf hin, dass der Überhang in erster Linie keinen kinetischen, sondern einen thermodynamischen Vorteil für die Verdrängung bedeutet.

Das Testsystem, in welchem die PNA(16) **105** durch einen 6nt-Überhang aus dem Komplex **105**·**106** durch Zugabe von PNA(22) **107** verdrängt wurde, wurde auf die Anwendung zur reversiblen Proteinmarkierung auf der Zelloberfläche übertragen. Durch den Donor **35** wurde der PNA(16)-Strang auf C-E3-EGFR-eGFP übertragen und durch Cy3-DNA(22) **109** fluoreszent markiert. Die Verdrängung der Cy3-DNA(22) durch PNA(22) **108** erfolgte zu ca. 24%. In einem Kontrollexperiment ohne Überhang war eine derartige Fluoreszenzminderung nicht zu beobachten. Der Vorteil der, wenn auch nur partiellen, Freilegung der PNA-tags wurde demonstriert, indem durch Zugabe zweifach komplementärer DNA die Internalisierung von EGFR induziert werden konnte.

Damit konnte die Anwendung des PNA-tags zur reversiblen Proteinmarkierung demonstriert werden. Allerdings besteht Bedarf darin, die Effizienz des Verdrängungsprozesses zu optimieren.

4.7) PNA-Oligomere zur kontrollierten Liganddimerisierung

4.7.1) Konzept der PNA-gesteuerten EGF-Präsentation

Multivalente EGF-Präsentation

PNA- und DNA-basierte Gerüste können, wie in Kapitel 2.4 vorgestellt, genutzt werden, um Liganden gezielt in bestimmbar Abständen und Orientierungen zueinander zu positionieren. Dabei spielen multivalente Systeme eine besondere Rolle, da die Präsentation von mehreren Liganden gegenüber einem Rezeptor, Rezeptorpaar oder -cluster zu drastischen Affinitätssteigerungen führen kann. Der im Fokus dieser Arbeit stehende EGFR und seine kanonischen Liganden stellen hierfür ein interessantes Untersuchungsmodell dar. In seiner Fähigkeit zur Homo- und Heterodimerisierung, sowie Bildung höherer Cluster, stellen multivalente Ligandensysteme eine Plattform dar, den Rezeptor zu aktivieren und bevorzugte Interaktionsmuster zu untersuchen. Der prominenteste Ligand des EGFR, der epidermale Wachstumsfaktor EGF wurde bereits in einer Vielzahl an Modellstrukturen organisiert: als Homodimer^[314] oder Heterodimer mit anderen Hormonen,^[314, 315] an Coiled-Coil Peptiden,^[247, 316-318] an PEG-basierten Systemen^[314], in oligomerer Form^[319-321] z.B. zum Wirkstofftransport^[322] und an Oberflächen.^[316, 323] Als Wachstumshormon ist der EGF Ligand mehrerer Rezeptoren der EGFR-Familie so etwa des HER1 (EGFR) und HER2. Je nach Zelllinie und dessen Rezeptorexpression, sowie Konzentration des Liganden kann die EGF-Dimerisierung zu verschiedensten Effekten wie Motilität^[314] einerseits oder Apoptose^[321] andererseits führen. Durch die Kombination zweier verschiedener Liganden, wie etwa des EGF mit dem VEGF können bifunktionale Systeme geschaffen werden.^[315] In Anbetracht der Vielzahl verwandter EGFR-Liganden können somit Einblicke in die komplexen Rezeptornetzwerke ermöglicht werden (Abb. 74).^[324, 325]

Konzept

Nachdem in Kapitel 4.3 gezeigt werden konnte, wie PNA-Oligomere genutzt werden können, um den EGFR zu dimerisieren, sollte nun der Ligand EGF über PNA-DNA-Interaktion in Homodimeren angeordnet werden (Abb. 74). PNA wurde auch hier als ein nützliches Werkzeug zur Kontrolle über Stöchiometrie und des Abstands der Liganden erachtet. Gegenüber bereits bekannten, zumeist Coiled-Coil- oder PEG-basierten Systemen ergeben sich folgende Vorteile:

I) Austauschbarkeit der Liganden: sind PNA-Ligand-Konjugate erstmal hergestellt, so kann über die Wahl des Templatstrangs jede Stöchiometrie und Anzahl beliebig eingestellt werden und verschiedene Liganden, EGF, TGF α etc., ausgetauscht und kombiniert werden.

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

II) Kontrolle über die Abstände: PNA-DNA-Gerüste bieten die Möglichkeit, über Kenntnis der dreidimensionalen Duplex-Struktur Abstände zwischen einzelnen Liganden präzise zu steuern. Die Flexibilität kann zusätzlich über Abstandhalter moduliert werden. In Abhängigkeit von den Abständen und Affinitäten der Liganden kann es in der Natur zu Multivalenz (verstärkte Bindung an ein Zielmolekül) oder Quervernetzung (Verbrücken mehrerer Zielmoleküle) kommen. Dies kann über PNA-DNA-Gerüste gesteuert werden.

In Hinblick auf aktuelle Theorien zur EGFR-Cluster-Bildung wäre es von besonderem Interesse, jene Abstände einzustellen, die in den vorgeschlagenen EGFR-Oligomeren zu einer Aktivierung führen würden. Es sollte nun zunächst untersucht werden, ob funktionale PNA-konjugierte Liganden EGF und TGF α synthetisch hergestellt und an einem komplementären DNA-Strang hybridisiert werden können.

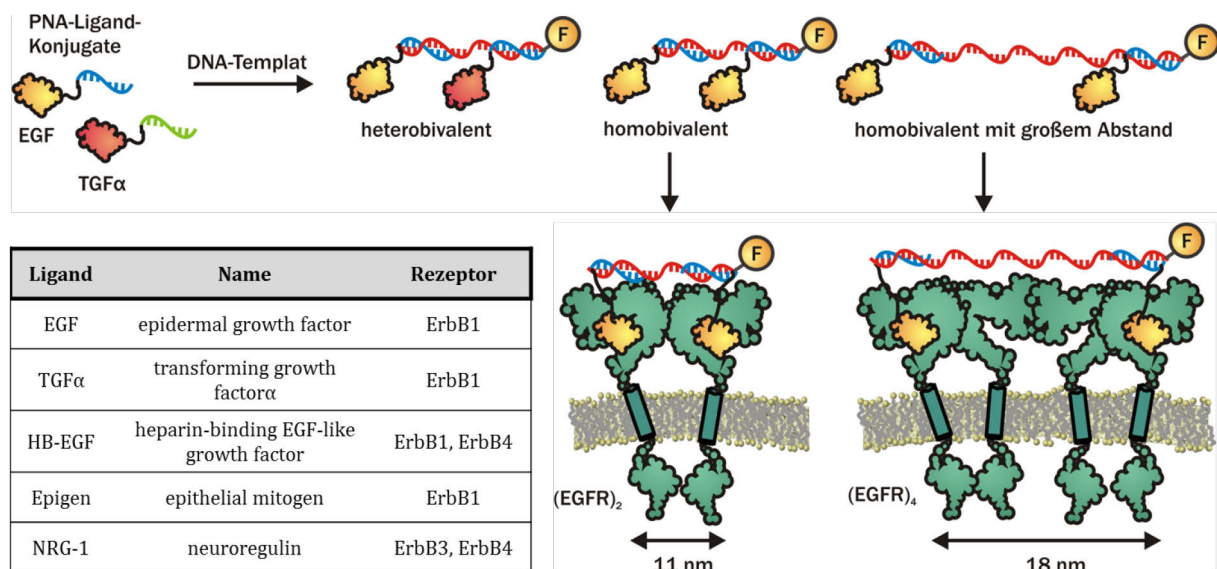


Abb. 74 Dimerisierung von EGFR-Liganden an PNA-DNA-Strukturen. PNA-Ligand-Konjugate können entlang von DNA-Strängen in homo- und heterobivalenter Weise präsentiert werden. Durch verschiedene Abstände sollten dann verschiedene Clustergrößen adressierbar sein. Liganden, wie sie in der Tabelle für die Familie der ErbB-Rezeptoren dargestellt sind, können derartig kombiniert werden, dass sie einen oder mehrere Rezeptoren verbinden.

4.7.2) Synthese von PNA-EGF-Konjugaten

Um eine kontrollierte Dimerisierung von Proteinen an DNA-PNA-Gerüsten zu ermöglichen, wurden zunächst die entsprechenden PNA-Protein-Konjugate erzeugt. Hierfür wurde eine Ligationreaktion benötigt, die beide Moleküle verbindet, ohne mit den natürlich bestehenden Funktionalitäten zu interagieren.^[326] Eine robuste Methode, die den Standard in der Peptid-Ligation zur Erzeugung größerer Proteine darstellt, ist die native chemische Ligation (NCL, Kapitel 2.1).^[78] Es sollten also ein PNA-Oligomer mit C-terminalem Thioester und der Ligand mit N-terminalem Cystein zur Reaktion gebracht und damit deren kovalente Verbindung erzeugt

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

werden (Abb. 75A). Der N-Terminus des EGF wurde gewählt, da dieser Bereich des Proteins für die Bindung an den Rezeptor nicht notwendig ist und erwiesenermaßen ohne Verlust der Affinität modifiziert werden kann.^[318] PNA-Oligomere haben hierbei gegenüber DNA nicht nur den Vorzug einer höheren Duplexstabilität, sondern erlauben zudem einen einfachen Einbau der Thioesterfunktion über SPPS. Wie in Abb. 75C gezeigt sollten PNA-Oligomere über Boc-Strategie als Mercaptopropionsäure-(MPA)-Thioester an der festen Phase hergestellt werden. Die Liganden hEGF (humaner EGF) und TGF α mit Längen von 53 und 50 Aminosäuren sind über Festphasensynthese zugänglich und sollten mit einem zusätzlichen N-terminalen Cystein automatisiert hergestellt werden. Die aufgereinigten Thioester und Cysteiny-Proteine sollten anschließend in der NCL verknüpft und die Proteine in ihre funktionale Form gefaltet werden.

Synthese der Cystein-modifizierten Proteine EGF und TGF α

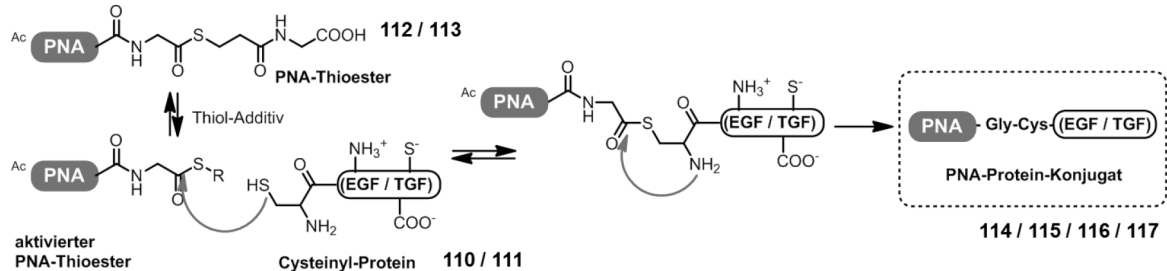
Die Synthese des EGF wurde bereits beschrieben und verlief ohne Schwierigkeiten.^[327, 328] TGF α wies nach der präparativen HPLC noch Verunreinigungen auf, welche nach der NCL beseitigt wurden. Die Schwierigkeit in der Synthese der Proteine lag hauptsächlich in ihrer Löslichkeit während und nach der Abspaltung. Bei Zugabe von TFA, TIS und Wasser wurde bereits nach einigen Minuten die Präzipitation der Proteine beobachtet. Die Abspaltung wurde abweichend vom üblichen Protokoll mit immer wiederholten TFA/TIS/H₂O-Waschschritten durchgeführt und die vereinigten Abspaltlösungen unter Luftstrom eingeeengt. Auch für die Aufreinigung über präparative HPLC mussten mehrere Injektionen mit erhöhtem Anteil an TFA verwendet werden. Die ungefalteten, gereinigten Proteine, EGF im Besonderen, zeigten zwar auch in gepufferten wässrigen Medien eine schlechte Löslichkeit, konnten aber in der NCL eingesetzt werden.

Synthese der PNA-Thioester und Konjugation über NCL

Die Synthese der PNA-Sequenzen mit C-terminalem Cystein wurde an Glycin-beladenem MBHA-Harz durchgeführt und als erster Baustein Trityl-geschützte Mercaptopropionsäure (Trt-MPA) verknüpft. Durch die Kupplung von Glycin wurde die Thioesterfunktion generiert und die PNA-Sequenz durch Cbz-Seitengeschützte Boc-Monomere am Harz aufgebaut. Nach Abspaltung und Reinigung wurde die 6mer-Sequenz **112** und eine 11mer-Sequenz **113** erhalten. Die kurzen Sequenzen sollten die Optimierung der PNA-Protein-Synthese im Vergleich zu längeren, unlöslicheren PNA-Sequenzen vereinfachen. In ersten Testligationen zeigte sich, dass der Zusatz des Additivs Mercaptophenyllessigsäure (MPAA) zum entgasten Puffer (200 mM Na₂HPO₄, 20 mM TCEP, pH 7.5) die Ligation beschleunigte und die Ausbeute auf bis zu 90% steigerte. Allerdings musste in der Synthese der PNA-Proteinkonjugate unter diesen Bedingungen festgestellt werden, dass sich das Additiv selbst über HPLC schlecht entfernen ließ. Deswegen

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

A) Synthese der PNA-Protein-Konjugate über NCL



B) Sequenzen der Cysteinyl-Proteine

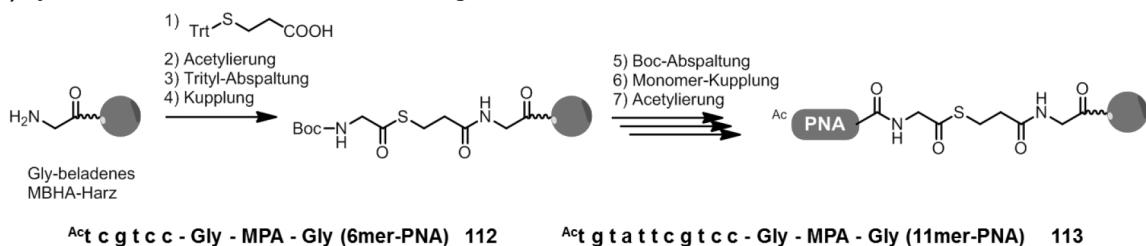
C-hEGF

C-NSDSECLSH¹⁰ DGYCLHDGVC²⁰ MYIEALDKYA³⁰ CNCVVG YIGE⁴⁰ RCQYRDLKWW⁵⁰ ELR⁵³ 110

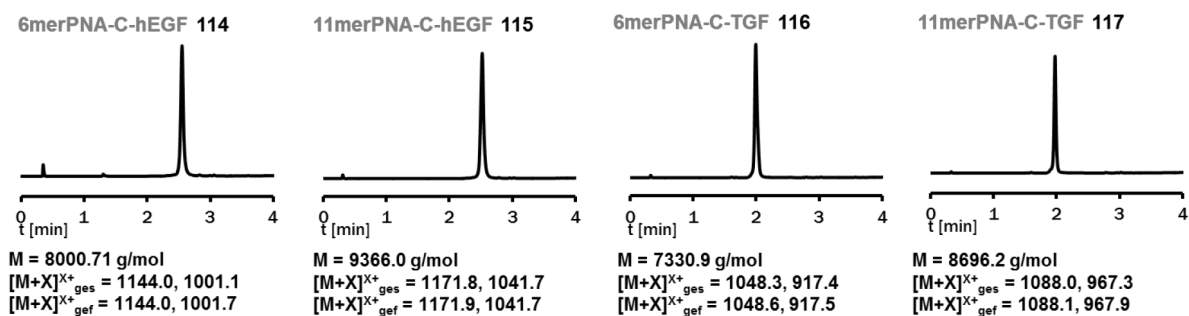
C-TGF α

C-VVSHFNDPCD¹⁰ SHTQFCFHGT²⁰ CRFLVQEDKP³⁰ ACVCHSGYVG⁴⁰ ARCEHADLLA⁵⁰ 111

C) Synthese der PNA-Thioester nach Boc-Strategie



D) Chromatogramme und ESI-MS-Daten der hergestellten Konjugate



E) Chromatogramme zur Synthese der 11mer-Konjugate 115 und 117

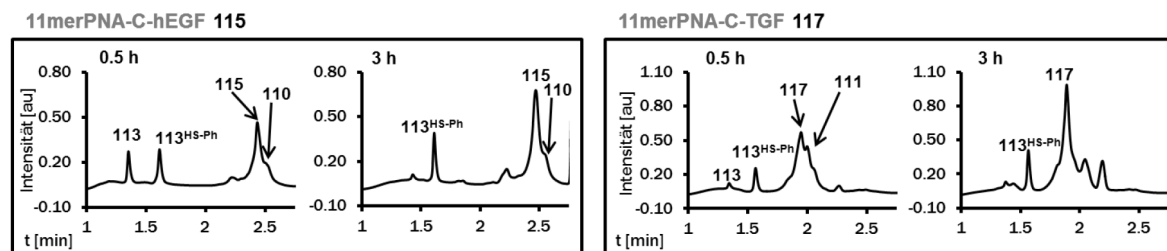


Abb. 75 Synthese der PNA-Protein-Konjugate A) NCL zwischen einem PNA-Thioester und dem Protein hEGF oder TGF α mit zusätzlichem N-terminalen Cystein. Trotz der ungeschützten Seitenketten im Protein erfolgt die kovalente Verknüpfung allein am N-Terminus, da der Umesterung die S \rightarrow N-Acylumlagerung folgt. B) Sequenzen der hergestellten Cysteinyl-Proteine C-hEGF **110** und C-TGF α **111**. C) Synthese der PNA-MPA-Thioester nach Boc-Strategie: 1) 10 Äq. Trt-MPA, 10 Äq. PyBOP, 12 Äq. NMM, 30 min in DMF 2) 5% Ac₂O, 6% 2,6-Lutidin in DMF, 5 min, 3) 2 x 15 min TFA : TIS (19 : 1), 4) 4 Äq. Boc-Gly-OH, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. NMM 30 min in DMF, 5) 5 min TFA : m-Kresol (95 : 5), 6) 4 Äq. Boc-PNA-Monomer(Cbz)-OH, 4 Äq. PyBOP, 8 Äq. NMM 30 min in DMF, 7) 5% Ac₂O, 6% 2,6-Lutidin in DMF, 5 min. Abspaltung: TFA : TFMSA : m-Kresol (16 : 3 : 1) für 3 h, D) Hergeleitete Verbindungen **114** – **117** und dazugehörige Chromatogramme (UPLCTM-MS: 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, 260 nm). E) Chromatogramme bei 0.5 h und 3 h für die Synthese von **115** und **117** (UPLCTM-MS: 03 – 90% Laufmittel B in 4 min, 210 nm. Peak ab 2.75 min: Thiophenol. Abkürzungen: ges – gesucht, gef – gefunden, XXX^{HS-Ph} – Thioester mit Thiophenol.

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

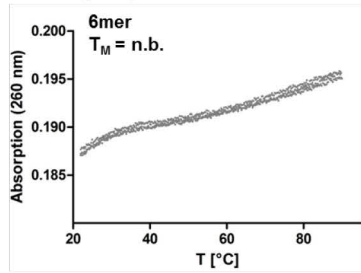
wurden die Konjugationen mit den vollständigen Proteinen und Verwendung von 20 mM Thiophenol durchgeführt. Es muss erwähnt werden, dass die Ligation an den vollständigen Proteinen hEGF und TGF α in sehr geringer Konzentration von 100 μ M Cysteinylprotein bzw. PNA-Thioester erfolgen musste, da die Löslichkeit der ungefalteten Proteine sehr schlecht war. Die Produktbildung über die Zeit wurde über UPLCTM-MS sichergestellt. Nach maximal drei Stunden Reaktionszeit war keine weitere Umsetzung beobachtbar.

4.7.3) Optimierung der PNA-Protein-Konjugate

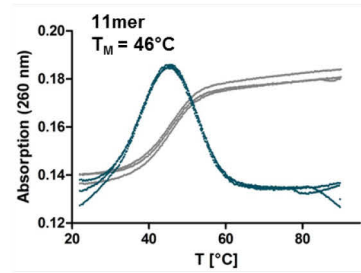
Es wurde zunächst evaluiert, inwiefern die 6mer- und 11mer-Konjugate für die DNA-gesteuerte Proteinpräsentation geeignet sind. Die PNA-Sequenzen ohne gebundenem Protein wurden in Anwesenheit der komplementären DNA-Stränge in der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und in thermischen Denaturierungsexperimenten untersucht. Die PAGE-Analyse zeigte im Fall der kurzen 6mer-PNA-Sequenz keine Duplexbildung und auch eine Schmelztemperatur war nicht bestimmbar (Gel siehe Kapitel 7.3.3). Im Gegensatz dazu zeigte die 11mer-Sequenz einen T_M von 46 °C und erzeugte eine Bande mit höherer Masse in der PAGE-Analyse (Abb. 76A). Von der weiteren Anwendung der 6mer-Sequenz wurde demnach abgesehen. Drei verschiedene DNA-Stränge wurden derart gewählt, dass sie zwei Äquivalente der 11mer-PNA bzw. den daraus resultierenden PNA-Protein-Konjugaten **115** und **117** binden können. Die Template **121** – **123** wurden mit verschiedenen Abständen **X** von 1, 11 und 21 Nukleotiden Länge zwischen den PNA-bindenden Einheiten ausgestattet. Zusätzlich wurden sie mit einem Cy3-Farbstoff versehen, um einerseits das Auslesen in der Gelelektrophorese zu erleichtern und zum anderen potentiell in der Fluoreszenzmikroskopie an Zellen anwendbar zu sein. Vergleichsweise wurde jeweils die reine DNA (1-3a) und die DNA mit zwei Äquivalenten PNA(11) **98** (1-3b) im Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. In allen Fällen bilden sich ein bis zwei neue Banden mit höherer Masse, was den einfach und doppelt hybridisierten PNA·DNA- und PNA₂·DNA-Doppelsträngen zugeschrieben werden kann (Abb.76C links). Allerdings war bei DNA **121** und **122** jeweils noch einzelsträngige DNA detektierbar. Im Fall von den DNA **123** kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da ein Teil der DNA auch ohne Zugabe von PNA **98** in der Tasche verbleibt. Wurden die Konjugate **115** und **117** mit DNA **121** hybridisiert, so zeigte sich jeweils eine leichte Bande mit höherer Masse, welche im Fall der reinen, synthetisch erzeugten Proteine EGF und TGF α nicht entstand. In der Summe wurde auch die Stabilität der 11mer-Konjugate als nicht ausreichend erachtet, da zelluläre Experimente eine Arbeitstemperatur von 37 °C erfordern und bereits unter den gegebenen Bedingungen keine zufriedenstellende Hybridisierung verzeichnet wurde.

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

A) Denaturierungsexperimente zu 6- und 11mer-PNA



6mer-PNA 118 $5'$ Ac tgc tcc Gly $3'$
6mer-DNA 119 $3'$ AGC AGG $5'$



11mer-PNA 98 $5'$ Ac tgc tat tgc tcc Gly $3'$
11mer-DNA 120 $3'$ AC ATA AGC AGG $5'$

B) Bivalente DNA-Template für 11mer-PNA

Cy3-DNA 121 - 123

$5'$ Cy3-GGA CGA ATA CA X GGA CGA ATA CA $3'$

Cy3-DNA(23) 121

X =

1 nt: T

Cy3-DNA(33) 122

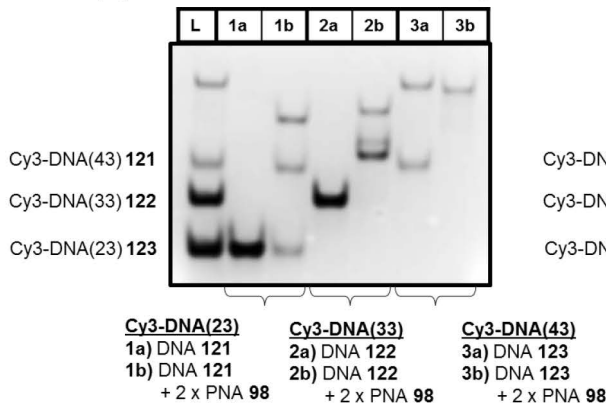
11nt: GAT AGG ACT CAG

Cy3-DNA(43) 123

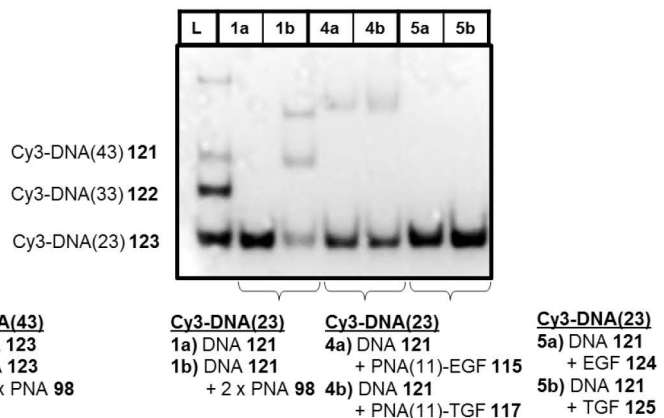
21 nt: GAT AGG ACT CAG ATA GGA CTC

C) Native Elektrophoresegele zur Hybridisierung der 11mer-PNA bzw. 11mer-PNA-Protein-Konjugate

PNA(11) mit verschiedenen bivalenten DNA-Template



Cy3-DNA(23) mit PNA, PNA-Protein und Protein



D) Optimiertes 16mer-PNA-Protein-Konjugat

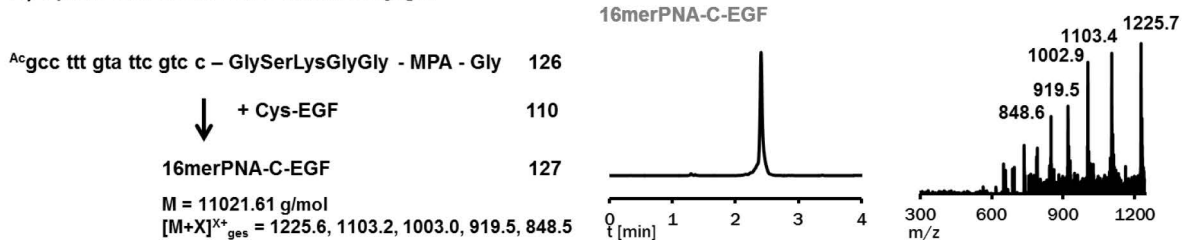


Abb. 76 Erste Experimente zu PNA-Protein-Konjugaten an DNA-Template. A) Thermische Denaturierungsexperimente zu 6mer- und 11mer-PNA-Oligomeren. Nur die 11mer-Sequenz **98** führt zu einem stabilen Duplex mit der komplementären DNA. B) DNA-Stränge zur bivalenten Hybridisierung der PNA(11)-Sequenz. Es wurden drei verschiedene Abstände von 1, 11 und 21 Nukleotiden (nt) in die Template **121**, **122** und **123** eingebaut. C) Die DNA-Template wurden auf ihre Duplexbildung mit PNA **98** in der nativen Gelelektrophorese getestet (links). DNA **121** wurde zudem auf die Interaktion mit PNA-Proteinkonjugaten **115** und **117** sowie den PNA-freien, reinen Proteinen EGF und TGF α untersucht. Bedingungen: natives Gel mit 15% Acrylamid, 160 V für 100 min bei 4 °C. Proben wurden in 1 μ M Konzentration je DNA-Template in DNA-Puffer vorab thermisch hybridisiert und je 8 pmol je Tasche aufgetragen. Detektion: λ_{ex} = 550 nm, λ_{em} = 600 nm. L – Leiter D) Optimiertes Konjugat **127** mit verlängerter PNA-Sequenz und Abstandhalter in **126**. UPLCTM-MS: Chromatogramm (Gradient 03 - 90% Laufmittel B in 4 min; 260 nm) und ESI-MS-Spektrum.

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein optimiertes PNA-EGF-Konjugat gestaltet. Dieses wurde auf Grundlage der 16mer-Sequenz hergestellt, die zuvor bereits Verwendung fand, da hierbei eine ausreichende Duplex-Stabilität mit DNA ($T_M = 66\text{ °C}$) für zelluläre Anwendung bekannt war. Auch die bereits vorhandenen bivalenten Cy3-DNA-Template **56** und **57** könnten dann weiterhin genutzt werden. Ergänzend wurde ein fünfaminosäurelanger Abstandhalter an den C-Terminus der PNA-Sequenz gesetzt, um eine räumliche Distanz und zusätzlich Flexibilität zwischen PNA-Oligomer und Protein zu erzeugen. Das entsprechende Konjugat **127** wurde analog den vorhergehenden mit dem Protein EGF hergestellt (Abb. 76D).

4.7.4) Faltung von EGF und EGF-PNA-Konjugaten

Um die native Aktivität eines Proteins zu ermöglichen, muss dieses in seiner korrekt gefalteten Form vorliegen. Im Fall des EGF ist es wichtig, dass alle drei Disulfidbrücken zwischen den sechs Cysteinen korrekt gebildet werden. Um das vorliegende, schwer lösliche fehlgefaltete Protein, in seine lösliche Form zu überführen, müssen ungewünschte Strukturen destabilisiert werden und unter oxidativen Bedingungen die Disulfidbrücken gebildet werden. Entsprechende Pufferbedingungen wurden in Anlehnung an literaturbekannte Faltungsprotokolle gewählt und zunächst am synthetisch hergestellten EGF **124** ohne PNA getestet und optimiert.^[328-330] Hierfür wurde die Änderung der Retentionszeit in der Umkehrphasenchromatographie und die Änderung der Masse bei Ausbildung der Disulfidbrücken in der UPLCTM-MS betrachtet. Dabei konnten 80% rückgefaltetes Protein erzeugt werden, wenn 83 μM EGF über 24 h in Puffer (0.1 M Tris·HCl, pH 8.5) unter Sauerstoffzufuhr in Anwesenheit von 2.5 mM 2-Mercaptoethanol gehalten wurde (Abb. 77). Um eine höhere Sensitivität der massenspektrometrischen Analyse zu erreichen, wurde in Zusammenarbeit mit David Bender (Arbeitsgruppe Prof. M. Linscheid, Humboldt-Universität zu Berlin) das unbehandelte und das gefaltete EGF in der ESI-FT-ICR (*electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance*)-Massenspektrometrie mit vorgeschalteter Flüssigchromatographie untersucht. Die gefundenen Massen konnten eindeutig der Ausbildung dreier Disulfidbrücken zugeschrieben werden. Allerdings konnten in geringem Maße auch Mercaptoethanol-Addukte gefunden werden, die vermutlich ebenso als Disulfide gebunden waren.

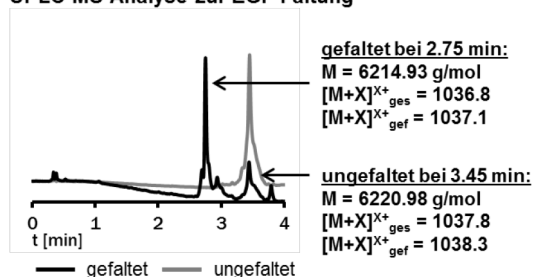
Bevor das gefaltete und durch eine größenspezifische Zentrifugationssäule gereinigte EGF **124** auf seine Funktionalität an Zellen geprüft werden sollte, sollte das Faltungsprotokoll auf das PNA-EGF-Konjugat **127** angewandt werden. Hierbei, und auch bei der Anwendung auf die Konjugate mit kürzeren PNA-Sequenzen, stellte sich heraus, dass die geringe Löslichkeit der

4.7) PNA-basierte Liganddimerisierung

PNA stark hinderlich war. Nicht nur ließen sich die Konjugate unter den Faltungsbedingungen nicht lösen, auch die Zugabe von Zusätzen wie DMSO und die Verringerung der Konzentration führten zu keiner Verbesserung. Auch eine Rückgewinnung durch Größenzentrifugation erwies sich als schwierig, da das Präzipitat die Membran blockierte. An dieser Stelle wurde die Arbeit an diesem Teilprojekt unterbrochen.

Naheliegende Möglichkeiten dem Problem zu begegnen wären: i) Zugabe komplementärer DNA zur Erhöhung der Löslichkeit bei der Faltung; ii) Synthese eines neuen PNA-EGF-Konjugats mit verbesserter Löslichkeit, etwa durch die Verwendung modifizierter PNA-Bausteine oder ergänzende geladene Aminosäuren.

UPLC-MS-Analyse zur EGF-Faltung



Massenvergleich vor & nach Faltung von EGF mittels ESI-FT-ICR

| ungefaltet | gefaltet | | [M+5H] ⁵⁺ | [M+6H] ⁶⁺ | [M+7H] ⁷⁺ | [M+8H] ⁸⁺ |
|------------|----------|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | ges. | 1243.99 | 1036.83 | 888.86 | 777.87 |
| | | gef. | 1243.76 | 1036.80 | 888.83 | 777.73 |
| | | ges. | 1245.20 | 1037.84 | 889.72 | 778.63 |
| | | gef. | 1244.97 | 1037.64 | 889.55 | 778.48 |

Abb. 77 Untersuchungen zur Disulfidbrückenbildung in EGF. Die Analyse über UPLCTM-MS (Gradient: 3 – 60% Laufmittel B in 4 min) zeigte eine Verschiebung in der Retentionszeit nach Faltung des Proteins (schwarz). Aus der Fläche der Signale bei 280 nm wurde ein Anteil von ca. 80% gefaltetem EGF ermittelt. Über Ionenfallenmassenspektrometrie wurde die Verminderung der Masse durch Disulfidbrückenbildung belegt (rechts).

4.7.5) Zusammenfassung von Kapitel 4.7

Es wurde die Synthese von PNA-Protein-Konjugaten über NCL vorgestellt. Drei verschiedene PNA-Sequenzen wurden als C-terminale Thioester mit den zwei verschiedenen Cysteiny-Proteinen C-EGF und C-TGF α von insgesamt 54 und 51 Aminosäuren Länge kombiniert. Während die Synthese etabliert werden konnte, erwies es sich nicht als möglich, die fertigen Konjugate zu der funktionalen Form zu falten. An dieser Stelle wird der Nachteil der geringen Löslichkeit von unmodifizierter PNA deutlich.

4.8) Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer

Konzept

Das Coiled-Coil-Peptidpaar K3/E3 wurde bereits erfolgreich genutzt, um Fluorophore in einer templatgesteuerten Transferreaktion vom K3- auf das E3-Peptid zu übertragen.^[82] Dabei wurden verschiedene Thioester-Einheiten, unter anderem MPAA (Mercaptophenyllessigsäure) und MPA (Mercaptopropionsäure) in den Donoren eingebaut. Kapitel 4.4 dieser Arbeit beschreibt, wie dieses Konzept erweitert werden konnte, indem orthogonale Coiled-Coil-Peptide den Transfer mehrerer Farbstoffe nebeneinander ermöglichen. Neben der Parallelisierbarkeit ist die intrazelluläre Anwendung Peptid-vermittelter Reaktionen erwünscht. Damit würde ein breites Spektrum an cytosolischen Proteinen beobachtbar werden. Eine Herausforderung dabei ist die Internalisierung des Donor-Peptids. Zum einen gilt es die Verbindung zellpermeabel zu machen, zum anderen muss das Donor-Molekül eine ausreichende Stabilität aufweisen. Die Zellmembran kann unter Nutzung aktiver Transportmechanismen oder durch direkte Penetration überwunden werden. Ein gängiges Vehikel zum Transport von Molekülen, die nicht permeabel sind, sind zellpenetrierende Peptide (CPP, *cell-penetrating peptide*). Diese meist helikalen, amphipathischen und positiv geladenen Peptide interagieren mit den negativ geladenen Gruppen und den lipophilen Ketten der Membran und sind in der Lage nicht nur selbst die Lipiddoppelschicht zu überqueren, sondern zudem eine molekulare Fracht in das Zellinnere zu befördern.^[331, 332] Diese CPPs sollten nun genutzt werden, um Donormoleküle für den Transfer von Fluorophoren zu generieren (Abb. 78). Es wurden zwei bekannte CPPs gewählt, um diese mit einer Thioestereinheit und einem Fluorophor auszustatten. Um die Stabilität des Thioesters zu gewährleisten, sollte neben dem bisher genutzten MPAA auch MPA getestet werden. Die peptidtemplatvermittelte Reaktionsführung setzt voraus, dass ein komplementäres Peptid das CPP erkennt und bindet. Hierfür wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit vorab je ein Bindungspartner (BP) für das CPP Oktaarginin (R8, RRRRRRRR) und das CPP-Analogon KLAL (KLALKLALKALKAAKLA) über Phagen-Display selektiert.^[333] Die Peptidpaare CPP_{R8}/BP_{R8} und CPP_{KLAL}/BP_{KLAL} zeigten im Fluoreszenzanisotropie-Assay Dissoziationskonstanten von je 218 nM und 355 nM (Abb. 79A). Zur intrazellulären Proteinmarkierung soll das POI mit BP als Fusionsprotein und einem N-terminalen Cystein exprimiert werden. Die Zugabe der zellpermeablen Donoren führt dann zur nicht-kovalenten Interaktion von CPP und BP und vermittelt damit den NCL-artigen Transfer des Fluorophors. Die TMR-Donoren wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit von Murat Eskin hergestellt (Abb. 79A). Um das Konzept des CPP-vermittelten Transfers zu testen, wurden zunächst Transferreaktion zwischen den Thioester- und Cysteiny-Peptiden in Puffer vorgenommen.

4.8) Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer

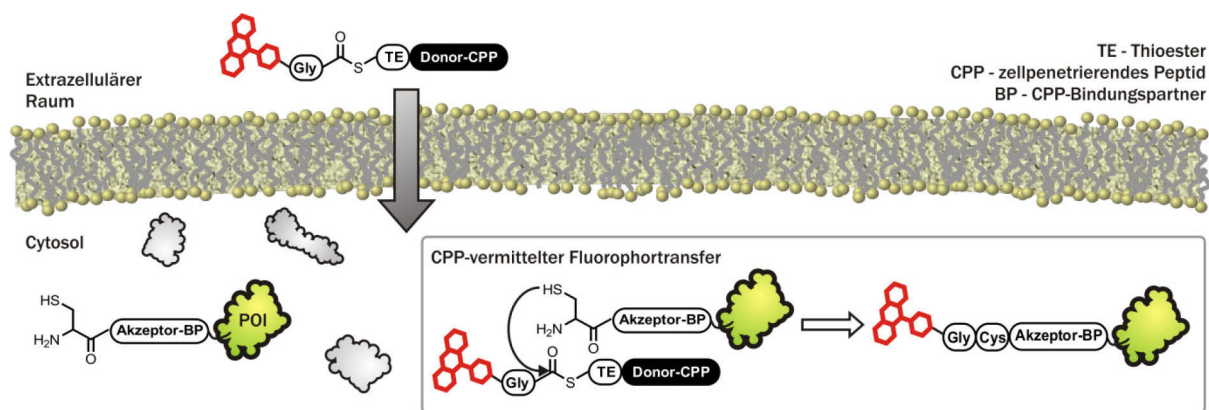


Abb. 78 Konzept des CPP-vermittelten Fluorophortransfers zur intrazellulären Proteinmarkierung.

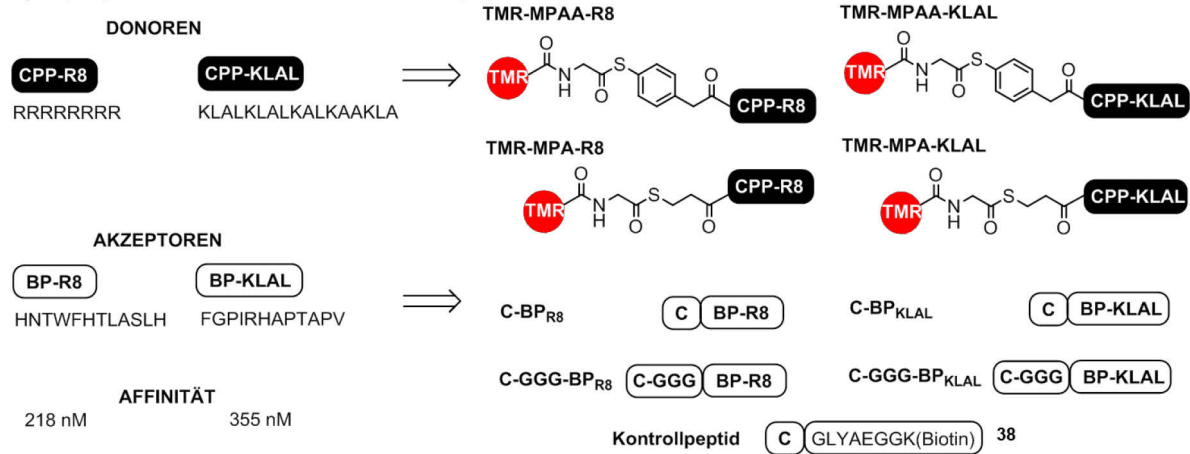
CPP-gesteuerter Transfer

TMR-Donoren und Akzeptorpeptide wurden analog den Coiled-Coil-basierten TMR- und Coumarin-Donoren aus Kapitel 4.4 nach Fmoc-Strategie hergestellt. Transferexperimente wurden in entgastem Phosphatpuffer (100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) in Anwesenheit von 1 mM TCEP durchgeführt. Die Analyse erfolgte über HPLC mit fluoreszenter Detektion bei TMR-spezifischen Wellenlängen ($\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$) und die Zuordnung der Verbindungen wurde durch UPLCTM-MS sichergestellt. Die qualitativen Ergebnisse aller Transferexperimente sind in Abb. 79B tabellarisch zusammengefasst. Es wird dabei keine Unterscheidung zwischen dem R8- und dem KLAL-System gemacht, da sich beide ähnlich verhalten.

Wurden in der Transferreaktion beide Peptide, der Donor und der jeweilige Akzeptor **C-BP**, in je 0.5 μM Konzentration vorgelegt, so kam es zu keiner Transferreaktion (Abb. 79C). Allein die Hydrolyse des Thioesters konnte beobachtet werden (MPAA bis zu 60 min, MPA bis zu 360 min Reaktionszeit). Auch wenn das Cystein über einen flexiblen Abstandhalter aus drei Glycin-Einheiten an **C-GGG-BP** präsentiert wurde, konnte kein Transfer beobachtet werden. Wurde die Konzentration an Reaktanden auf 5 μM erhöht, so kam es mit den Akzeptoren **C-GGG-BP** zur Bildung von Produkt sowie dem bereits beschriebenen doppelten Transferprodukt (vergleiche Kapitel 4.4). Dies stellte sich allerdings als nicht selektiv heraus, da bei der gleichen Konzentration von 5 μM auch der Transfer auf das Kontrollpeptid **38** beobachtet werden konnte (Abb. 80). Das Kontrollpeptid wurde so gewählt, dass es zwar über ein N-terminales Cystein verfügt, allerdings keinerlei Interaktion mit den Donor-Peptiden eingehen sollte. Dass die Reaktion von Thioestern bei diesen Konzentrationen auch ohne Templatkontrolle verläuft, ist mit Betrachtung vorhergehender Untersuchungen nicht unerwartet.^[207] Zur Sicherstellung wurde das bekannte K3/E3-System herangezogen. Wurde der TMR-MPAA-K3-Donor **45** und das Cysteinyl-E3-Peptid **36** verwendet, so wurde der erfolgreiche Transfer von TMR bei 0.5 μM und 5 μM Konzentration beobachtet. Eine Übertragung auf das Kontrollpeptid fand allerdings allein bei 5 μM Konzentration statt.

4.8) Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer

A) Peptidpaar CPP/BP für das R8- und KLAL-System



B) Ergebnisse der Transferexperimente

| | Donor | c | Akzeptor | | | |
|-------------------------------|--------------|--------|----------|----------|----------------|---------|
| | | | C-BP | C-GGG-BP | Kontrollpeptid | |
| CPP-Systeme (R8 bzw. KLAL) | TMR-MPAA-CPP | 5 µM | - | + | + | Zeile 1 |
| | TMR-MPA-CPP | 5 µM | - | + | + | Zeile 2 |
| | TMR-MPAA-CPP | 0.5 µM | - | - | - | Zeile 3 |
| | TMR-MPA-CPP | 0.5 µM | - | - | - | Zeile 4 |
| K3/E3-System | TMR-MPAA-K3 | 5 µM | + | n.b. | + | Zeile 5 |
| | TMR-MPAA-K3 | 0.5 µM | + | n.b. | - | Zeile 6 |

C) Chromatogramme an der HPLC-FL

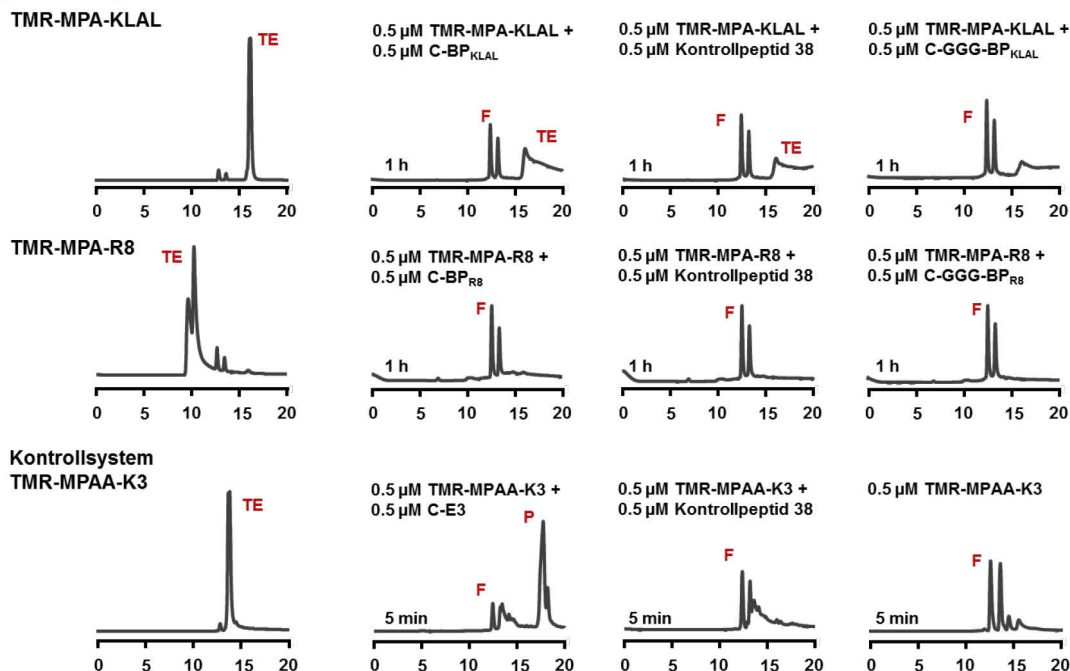


Abb. 79 Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer. A) Vier CPP-basierte TMR-Donoren wurden verwendet: für jedes CPP wurde MPAA und MPA als Thioester getestet. Der Transfer wurde entweder auf das Cysteiny-BP (C-BP_{R8} bzw. C-BP_{KLAL}) oder auf das analoge Akzeptorpeptid mit drei Glycin-Einheiten durchgeführt. B) Zusammenfassung der Transferexperimente: (+) - Transferprodukt bzw. DTP wurde gefunden; (-) - keine Produktbildung; n.b. - kein Experiment durchgeführt. C) HPLC-Untersuchung mit fluoreszenter Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$) der Reaktionen bei 0.5 µM Konzentration (20 - 80% Laufmittel B in 20 min). Gezeigt sind die Ergebnisse für die TMR-MPA-CPPs nach 60 min (Zeile 4) und das TMR-MPAA-K3-Kontrollsystem (Zeile 6) nach 5 min.

Schlussfolgerungen

Es zeigte sich, dass die Peptidpaare CPP/BP in beiden Fällen ungeeignet sind den Fluorophor TMR vom CPP selektiv auf das komplementäre Cysteinyl-Peptid zu übertragen (Zeile 3 und 4, Spalte 1). Interessanterweise bleibt eine Reaktion mit **C-BP** selbst bei 5 μM Konzentration an Reaktanden aus, was ausreichend sein sollte, um den Transfer selbst ohne Templatkontrolle zu ermöglichen (Zeile 1 und 2, Spalte 1). Dies deutet darauf hin, dass die CPPs mit ihren jeweiligen Bindungspartnern BP durchaus interagieren, allerdings die Positionierung der reaktiven Einheiten einen Transfer auf das jeweilige **C-BP** verhindert. Durch die Erweiterung der Akzeptoren auf **C-GGG-BP** waren die Einheiten wiederum flexibel genug, um bei 5 μM zu reagieren (Zeile 1 und 2, Spalte 2). Dennoch eigneten sich auch die Peptide **C-GGG-BP** nicht als Akzeptoren, da unter den Bedingungen der Spezifität durch Templatkontrolle, also bei 0.5 μM Konzentration, wiederum keine Reaktion erfolgte (Zeile 3 und 4, Spalte 2). Es ist anzunehmen, dass die Affinitäten der Bindungspartner nicht ausreichen. Zusammenfassend sind die selektierten Paare nicht geeignet. Folgende Optionen wären zur Optimierung denkbar:

- i) Optimierung der Peptide: es müssen stabilere CPP-BP-Peptidpaar gefunden werden. Dafür kann der Phagen Display wiederholt werden unter Anwendung härterer Waschbedingungen, die den Selektionsdruck erhöhen. Zudem können Bibliotheken an cyclischen Peptiden verwendet werden, welche durch ihre konformationelle Stabilisierung höhere Affinitäten aufweisen können.
- ii) Nicht-kovalente Markierung: es kann in Erwägung gezogen werden das System ohne Transferreaktion zur Markierung über die CPP-BP-Interaktion zu nutzen. TMR-CPP-Konjugate binden in dem Fall nicht-kovalent die BP-POI-Fusionsproteine.

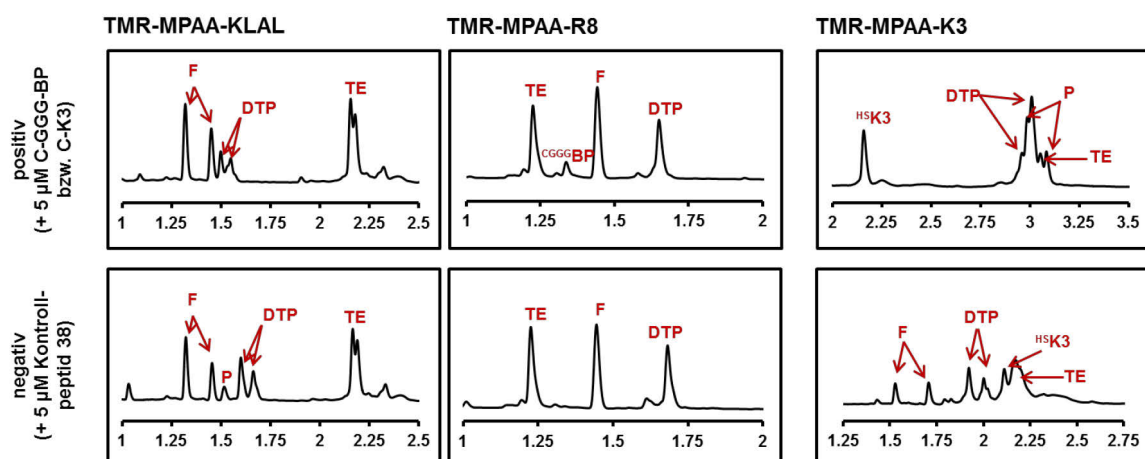


Abb. 80 UPLCTM-MS-Untersuchungen zum CPP-vermittelten Fluorophortransfer. Reaktionen wurden mit je 5 μM Donor- und Akzeptorpeptid für 10 min durchgeführt. Gezeigt sind beispielhaft die Chromatogramme für die Peptide mit Glycin-Abstandhalter (links und mittig) und das K3/E3-Kontrollsystem (rechts). Gradient: 20 – 90% Laufmittel B in 4 min, 260 nm. Abkürzungen: P – Produkt, DTP – doppeltes Transferprodukt, F – hydrolysiertes Fluorophor TMR-Gly-OH (beide Isomere; die Verschiebung der Retentionszeit für das K3/E3-Kontrollsystem im Vergleich zu den anderen Transferreaktionen ergibt sich daraus, dass diese Versuche zu einem späteren Zeitpunkt gemacht wurden).

4.8) Der CPP-vermittelte Fluorophortransfer

5) Zusammenfassung und Ausblick

5.1) Zusammenfassung

Strukturgebende Systeme spielen in der Chemie und chemischen Biologie eine große Rolle, da sie Reaktanden und Effektoren zielgerichtet organisieren und somit in ihrer Aktivität bestimmen können.^[8-10, 24, 87, 334] Auch in der Natur existieren zahlreiche Beispiele, wie hochgradig geordnete Systeme definierte Architekturen nutzen, um ihre Funktion zu erfüllen.^[335-340] Nukleinsäuren, sowie ihre Analoga (DNA, RNA, PNA etc.) und peptidische Strukturen (z.B. Coiled-Coil-Peptide) eignen sich zur Kontrolle über chemische Reaktionen und Proteinaktivitäten.^[18, 100, 101, 222] In dieser Arbeit wurden PNA-DNA- und Coiled-Coil-Interaktionen genutzt, um Proteine an lebenden Zellen zeitgleich zu markieren und in ihrer Aktivität gezielt zu modulieren. Dabei fungierte jeweils das Peptid bzw. das PNA-Oligomer als *tag*, also als Erkennungssequenz. Ein Spektrum an potenziell generisch anwendbaren Methoden wurde entwickelt und die Verwendung an Rezeptoren beziehungsweise dem cytosolischen Protein Syk demonstriert.

Der PNA-Transfer

Die Möglichkeit eine DNA- oder PNA-Sequenz in einem nachfolgenden Schritt durch Zugabe eines funktionalisierten komplementären Strangs zu adressieren, macht die Erzeugung von DNA/PNA-Protein-Konjugaten auf lebenden Zellen zu einem universellen und attraktiven Werkzeug. Um dies zu bewerkstelligen, wurde das Konzept des Coiled-Coil-vermittelten PNA-Transfers entwickelt. Die Vorteile einer kleinen Erkennungseinheit (22 Aminosäuren) und einer selektiven Transferreaktion, die zu einer kovalenten Verknüpfung führt, wurden dabei mit den Vorzügen einer PNA-Sequenz (z.B. steuerbare Hybridisierung) verbunden. Auf Basis des Coiled-Coil-Paars K3/E3 wurden K3-basierte PNA-Donoren erzeugt, die den PNA-Strang selektiv auf das Cysteiny-E3-Akzeptorpeptid übertragen (Abb. 81A). Wird der C-E3-Akzeptor als Fusionsprotein mit dem POI (*protein of interest*) exprimiert, so entstehen selektiv PNA-POI-Konjugate.

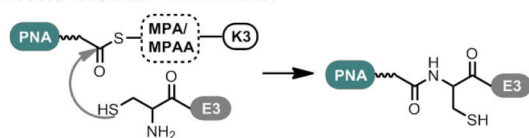
Um die Verknüpfung des Proteins mit PNA zu bewerkstelligen, wurden PNA-Peptid-Konjugate mit einer reaktiven Gruppe ausgestattet, die entweder einen Thioester-vermittelten Acyltransfer (Abb. 81A, links) oder einen Sulfonat-basierten Alkyltransfer (Abb. 81A, rechts) ermöglichen. Die Synthese der Acyl- bzw. Alkyl-Donoren wurde über eine konvergente Route etabliert, sodass die PNA-Sequenz leicht variiert werden kann (Abb. 81B). Ein Satz an Donor-Konjugaten wurde über SPAAC hergestellt und jeweils der PNA-Transfer auf das komplementäre C-E3-Peptid **36** untersucht (Abb. 81C). Alle Donoren bewirkten einen PNA-Transfer, doch der mit Abstand schnellste Transfer erfolgte an Thioester-verbrückten PNA-Peptid-Konjugaten. Der Transfer

5.1) Zusammenfassung

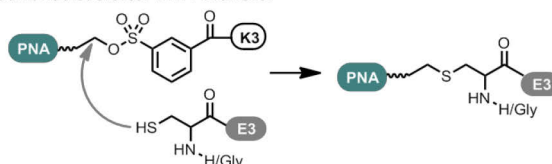
über Mercaptophenyllessigsäure(MPAA)-basierte Donoren verlief innerhalb weniger Minuten und ergab im besten Fall nahezu quantitative Ausbeuten (Donor **27** und **29**). Eine weitere Beschleunigung konnte durch die optimierte Positionierung der reaktiven Einheiten erreicht werden, indem eine Aminohexansäureeinheit zwischen Thioester und K3-Peptid platziert wurde (z.B. in Donor **29**). Die Transferausbeute war in jedem System abhängig von der Länge der übertragenen Sequenz – je länger die PNA, umso geringer die Ausbeute. Die geminderte Produktausbeute war allerdings nicht der Hydrolyse des Thioesters geschuldet, sondern der verstärkten Bildung des doppelten Transferprodukts **DTP** (das freie Seitenketten-Thiol von Cystein im Produkt reagiert nach NCL nochmals zum Cysteinylthioester). Für den MPAA-basierten Transfer einer 11mer-Sequenz über Donor **28** beispielsweise liegen am Ende 40% des

A) PNA-Transferreaktion über K3/E3-Interaktion

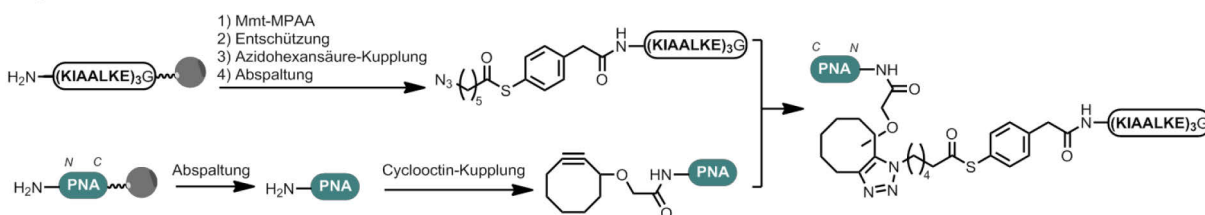
Thioester-basierter PNA-Transfer



Sulfonat-basierter PNA-Transfer



B) Synthese von PNA-Donoren mit MPAA-Funktion über SPAAC



C) Vergleich der Transferreaktionen über MPAA-, MPA- und Sulfonat-vermittelten Transfer

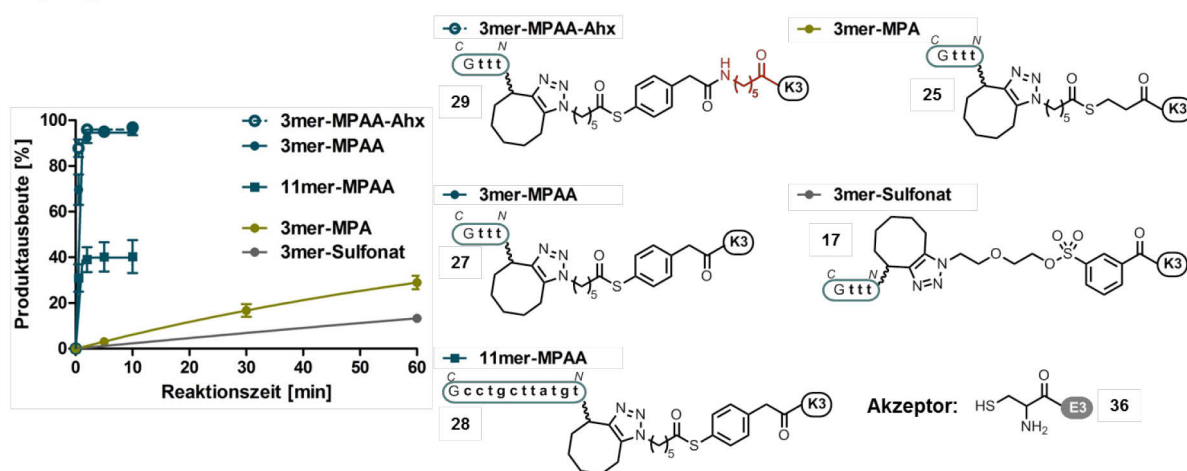


Abb. 81 PNA-Transfer an K3/E3-Coiled-Coil-Peptiden. A) Der Transfer wurde auf Basis von Thioestern in einer NCL-artigen Übertragung, oder auf Grundlage von Sulfonaten durch eine Alkylierungsreaktion bewerkstelligt. B) Konvergente Synthese von PNA-Donoren über SPAAC zwischen dem Azido-Peptid und der Cyclooctin-PNA. Anstelle von Mmt-MPAA kann analog Mmt-MPA oder der vorab synthetisierte Azido-sulfonat-Baustein gekuppelt werden. C) Einige PNA-Donoren und deren Fähigkeit zur Produktbildung mit dem C-E3-Peptid **36** in Puffer über die Zeit. Ahx – Aminohexansäure, MPAA – Mercaptophenyllessigsäure, MPA – Mercaptopropionsäure, SPAAC – strain promoted azide-alkyne cycloaddition

5.1) Zusammenfassung

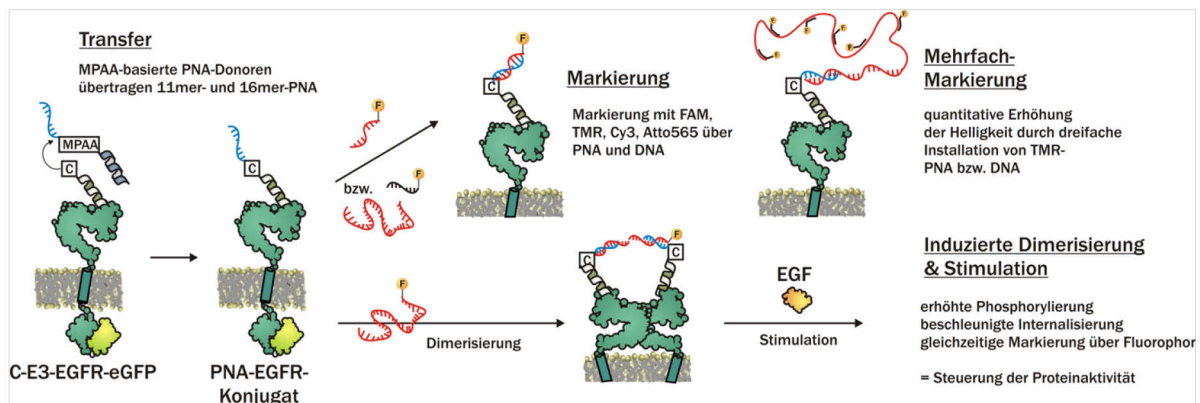
Akzeptorpeptids als Produkt und 30% als **DTP** vor. Für die Anwendung in der zellulären Markierung bedeutet das eine Gesamtausbeute von 70% an PNA-tragenden Proteinen. Wird der Donor im Überschuss vorgelegt, kann dies allerdings noch gesteigert werden.

Der Thioester-vermittelte PNA-Transfer wurde an Rezeptoren aus zwei prominenten Membranproteinfamilien, GPCR und RTK, erprobt. Hierzu wurden die Proteine auf genetischer Ebene N-terminal mit der C-E3-Erkennungssequenz ausgestattet. Die GPCRs hY₁R und hY₂R, ebenso wie das EGFR-eGFP-Fusionsprotein wurden selektiv mit dem PNA-tag durch Anwendung der Donoren **30** (11mer PNA) oder **35** (16mer PNA) versehen (Abb. 82B). Das Auslesen gelang sowohl durch Hybridisierung mit der komplementären PNA (**42**) als auch mit DNA (**46 – 48**), welche hierfür mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wie FAM, TMR, Cy3 und Atto565 ausgestattet wurde. Diese Methode ermöglicht somit eine leichte Austauschbarkeit der Fluorophore, wie es bei kaum einer anderen Proteinmarkierung der Fall ist. Da fluorescent markierte DNA kommerziell erhältlich ist, ist der Wechsel des Fluorophors mit wenig Aufwand verbunden und eine breite Palette verschiedenster Farbstoffe ist dem Anwender zugänglich. Zudem konnte die Helligkeit durch die Methode der „Mehrfach-Markierung“ gesteigert werden, was es ermöglichen könnte auch Zielmoleküle von geringer Konzentration auf der Zelloberfläche sichtbar zu machen (Abb. 82A). Über die Visualisierung hinaus war es erstmalig möglich, den installierten PNA-tag am EGFR zu nutzen, um den Rezeptor kontrolliert zu dimerisieren und die daraus resultierenden Effekte auf die Proteinaktivität zu untersuchen. Als primäres Resultat der EGFR-Aktivierung folgt die Autophosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Internalisierung und Degradation. Es konnte im Western Blot, wie auch im Immunofluoreszenz-Assay gezeigt werden, dass die Anwendung von verbrückender Cy3-DNA **56** bzw. **57** vor der Zugabe des Liganden EGF zu einer fast 2-fach gesteigerten relativen Phosphorylierung des Rezeptors führte (Abb. 82C). In Abwesenheit des Liganden EGF oder bei Anwendung einer nicht-verbrückenden DNA **47** waren derartige Erhöhungen in der Aktivität nicht zu verzeichnen. Auch die nachgelagerte Internalisierung und Degradation konnte im verminderten GFP-Signal im Western Blot-, im Immunofluoreszenz-Assay und in der Bildung von Vesikeln im Cy3- bzw. im GFP-spezifischen Kanal in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden (Abb. 82C). Damit wurde demonstriert, dass die Rezeptordimerisierung kontrolliert herbeigeführt werden konnte und zelluläre Folgeprozesse gezielt moduliert wurden.

Diese Art der gezielten, gleichzeitigen Rezeptororganisation und -visualisierung stellt ein Novum dar und eröffnet Möglichkeiten in der Proteinuntersuchung, wie auch im therapeutischen Bereich. Wird etwa die Dimerisierung von Wachstumsfaktorrezeptoren an Tumorzellen mit überexprimiertem EGFR gezielt unterdrückt, könnte die Proliferation vermindert werden.

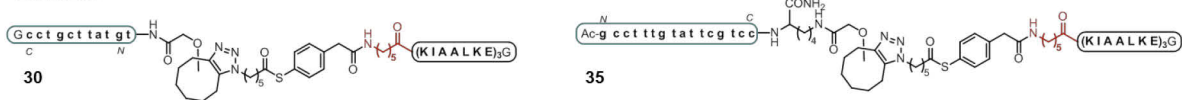
5.1) Zusammenfassung

A) Realisierte Anwendungsmöglichkeiten des PNA-Transfers



B) Markierung / Mehrfachmarkierung an GPCRs und EGFR

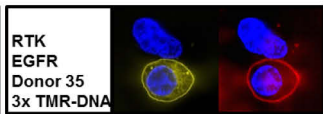
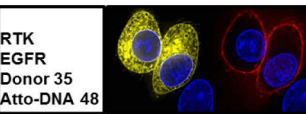
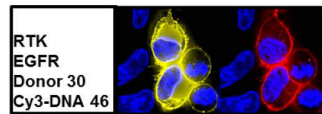
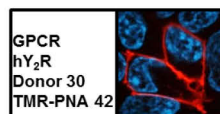
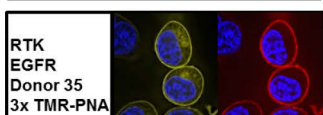
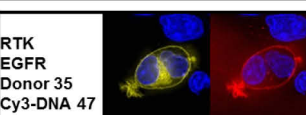
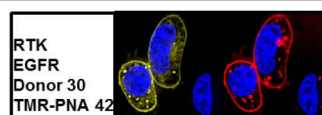
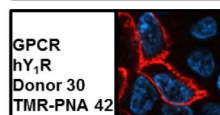
Donoren



Fluorophor-PNA bzw. -DNA

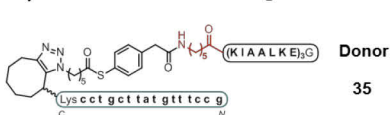


Markierung

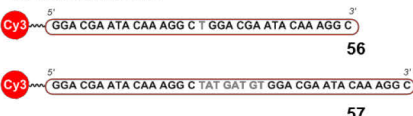


Mehrfach-Markierung

C) Induzierte Dimerisierung des EGFR



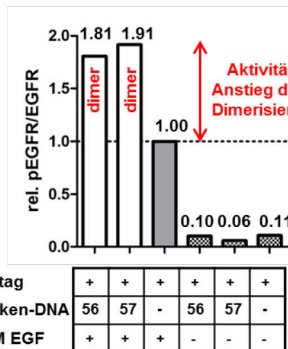
Verbrückende DNA



Monovalente DNA



Western Blot-Analyse



Immunofluoreszenz-Assay

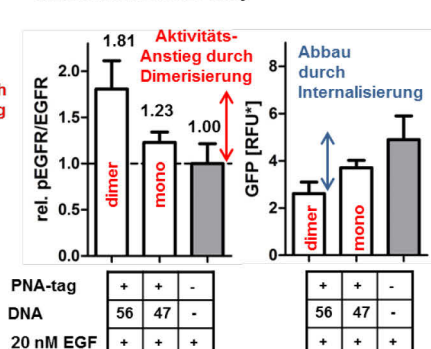


Abb. 82 Markierung und induzierte Dimerisierung des EGFR. A) Nach Transfer einer PNA-Sequenz über MPAA-basierte Donoren auf den EGFR wurden die Anwendungen Markierung bzw. Mehrfach-Markierung und induzierte Dimerisierung des Rezeptors demonstriert. B) Über Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die PNA-Sequenz durch Donor 30 (11mer) oder Donor 35 (16mer) übertragen und durch fluoreszente PNA oder DNA (z.B. 42, 46, 47, 48) adressiert werden kann. Jene Zellen, die mit C-E3-EGFR-eGFP transfiziert wurden (gelb) zeigten eine anschließende Markierung (rot). Über Mehrfach-Markierung konnten drei fluoreszente PNA- oder DNA-Sequenzen je Rezeptor angebracht werden. C) Durch Donor 35 übertragene PNA konnte durch verbrückende DNA 56 oder 57 derart adressiert werden, dass zwei EGF-Rezeptoren in räumliche Nähe gebracht wurden. Die erhöhte relative Phosphorylierung wurde in Western Blot- und Immunofluoreszenz-Analyse nachgewiesen. Die Absenkung des GFP-Signals zeigt gleichzeitig die Internalisierung und Degradation des aktivierten Rezeptors an. Wurde monovalente DNA 47 verwendet, konnte keine derartig hohe Phosphorylierungserhöhung beobachtet werden.

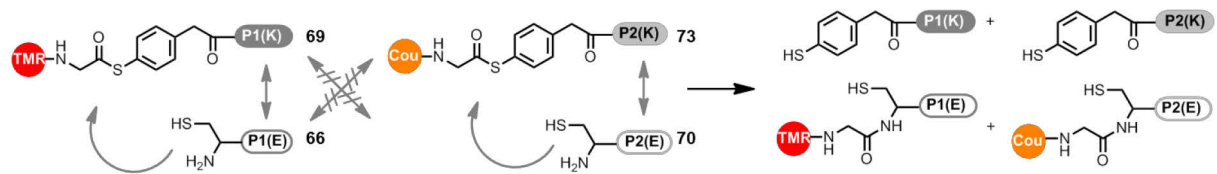
Coiled-Coil-basierte Systeme

Das Coiled-Coil-Peptidpaar K3/E3 erlaubt es, einen Fluorophor oder eine PNA-Sequenz vom Donor- auf das Akzeptorpeptid zu übertragen. Sollen allerdings mehrere verschiedene Reportermoleküle (PNA-Stränge oder Farbstoffe) gleichzeitig und selektiv auf unterschiedliche Proteine übertragen werden, so bedarf es orthogonaler Coiled-Coil-Peptidpaare.^[22] In dieser Arbeit wurde der parallele Transfer der Fluorophore TMR und Coumarin343 (Cou) über die orthogonalen Peptidpaare P1 und P2 etabliert (Abb. 83A). Der Fokus lag dabei neben dem schnellen Transfer auch auf der Selektivität der einzelnen Reaktionen. Optimale Ergebnisse wurden für die Übertragungen mit dem Donor TMR-MPAA-P1(K) **69** auf den Akzeptor C-P1(E) **66** und dem Donor Cou-MPAA-P2(K) **73** auf den Akzeptor C-P2(E) **70** erzielt. Das P1-Paar zeigte dazu eine erstaunlich schnelle Reaktion und ermöglichte eine vollständige Umsetzung in Produkt und doppeltes Transferprodukt innerhalb von 15 s! Die parallele Durchführung der Transferreaktionen an P1- und P2-Peptiden zeigte die Bildung der gewünschten Produkte unter Erhalt der Selektivität: es konnten keine Signale in der HPLC- oder der MS-Analyse beobachtet werden, die eine Kreuzreaktivität nahelegen würden. Da zahlreiche Rezeptoren unter Bildung von Heterodimeren mit einander interagieren, ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Markierung durch parallele Transferreaktionen ein wertvolles Werkzeug in der Proteinanalyse. Unter den GPCRs ist das Endothelin-System ein interessantes Beispiel, in dem die Interaktion von ET_AR und ET_BR eine Rolle in der vaskulären Regulation spielen könnte. Erste Untersuchungen an C-P1(E)-ET_AR und C-P1(E)-ET_BR zeigten, dass das hier etablierte P1-Peptidpaar zur Rezeptor-markierung an lebenden Zellen geeignet ist.

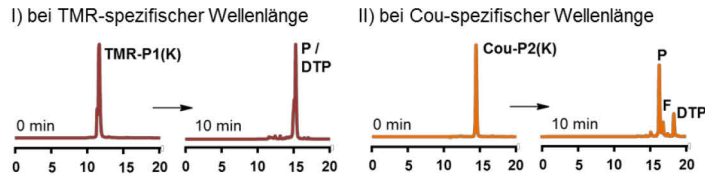
In einem weiteren neuartigen Ansatz wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass die Anwendung von Coiled-Coil-Peptiden keinesfalls auf die Templatkontrolle in der Reaktionsführung limitiert ist, sondern Coiled-Coils auch Teil eines dynamisch schaltbaren Systems sein können, welches die Proteinaktivität steuert.^[311] Das Paar K3/E3 wurde dafür asymmetrisch mit einem Coil-Überhang versehen (Abb. 83B). Bindet Peptid **IV** das verlängerte Peptid **V**, so wird ein Coiled-Coil-Komplex erzeugt. Durch Zugabe des ebenfalls verlängerten Peptids **III** wird das Aufbrechen des gebildeten Komplexes **IV•V** bewirkt. Die erneute Zugabe eines Äquivalents an **V** führt wiederum zur Bildung von **IV•V**. In einem Fluoreszenz-Assay konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess in repetitiven Zyklen geschaltet werden kann und die Parameter, die diese Prozesse steuern, wurden systematisch untersucht. Bereits 0.5 – 1 Heptade erwies sich als ausreichend, um eine effektive Steuerung zu ermöglichen. Dies legte die Grundlage für Experimente, in welchen die Schaltbarkeit von Coiled-Coil-Systemen genutzt wurde, um zwischen einem mono- und bivalenten Zustand zu wechseln und damit die Affinität des Proteins Syk gegenüber seinem Bindungspartner zu modulieren. Das Erkennungsmotiv „pYXXI/L“ wurde mit hoher Affinität

5.1) Zusammenfassung

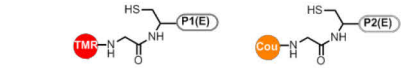
A) Orthogonale Coiled-Coil-Peptide zum parallelen Transfer zweier Fluorophore



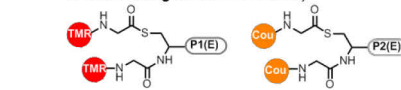
Untersuchung der parallelen Reaktion über HPLC mit fluoreszenter Detektion



P – Produkt



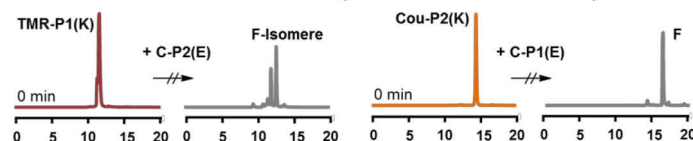
DTP – Doppeltes Transferprodukt (durch Fluorophor-Transfer auf gebildetes Produkt)



F – Fluorophor-Gly (durch Hydrolyse des Thioesters)



Kontrollen zwischen P1-Donor/P2-Akzeptor bzw. P2-Donor/P1-Akzeptor

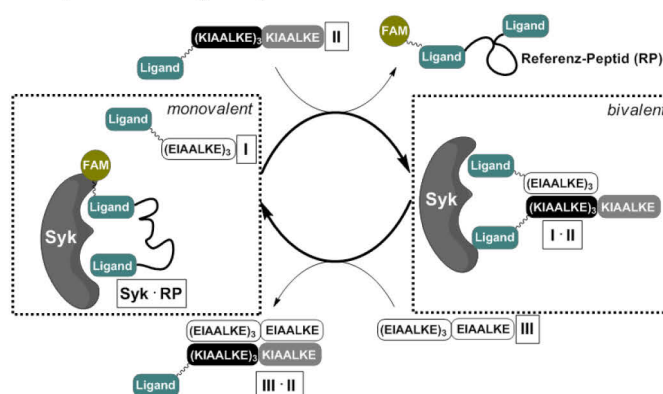


Peptidsequenzen

P1(E) (EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY) P2(E) (EIQQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY)
P1(K) (KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY) P2(K) (KIAQLKQ KIQALKQ ENQQLEE ENAALEY)

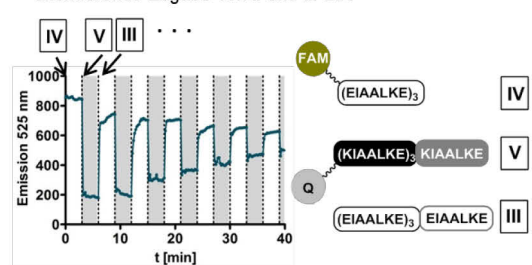
B) Dynamische Coiled-Coil-Systeme zum Schaltung zwischen Mono- und Bivalenz

Konzept zur Schaltung der Syk-Affinität

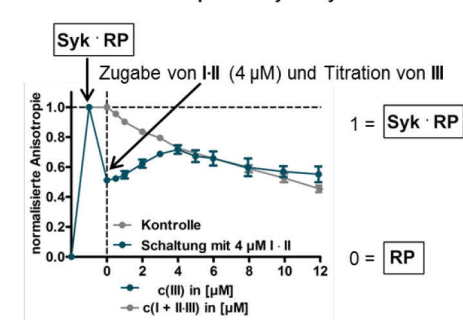


Fluoreszenz-Assay zur Testung

alternierende Zugabe von II und III zu I



Fluoreszenzanisotropie-Assay an Syk-Kinase



Kontrollmessung der Syk-Affinität von I + II-III

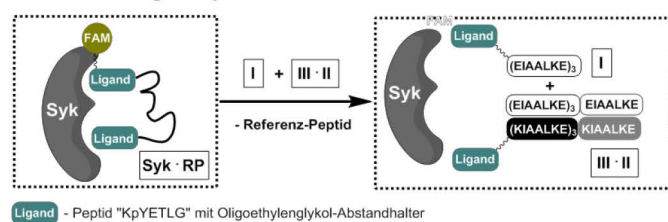


Abb. 83 Coiled-Coil-basierte Systeme. A) Orthogonale Coiled-Coils zur Proteinmarkierung. Zur parallelen Markierung zweier verschiedener Rezeptoren mit zwei Farbstoffen wurden die Donoren TMR-MPAA-P1(K) und Cou-MPAA-P2(K) selektiert. Beide Transferreaktionen auf C-P1(E) und C-P2(E) verlaufen selektiv. B) Dynamische Coiled-Coils zur Proteinmodulation. In einem Fluoreszenz-Assay wurde die durch **III** reversible Bildung des Komplexes **IV·V** untersucht. Die Schaltung von Syk wurde in einem Fluoreszenzanisotropie-Assay verfolgt: Ist das Referenz-Peptid **RP** an Syk gebunden, ist die Anisotropie hoch (= 1). Bei Zugabe von Komplex **I·II** sinkt sie in Abhängigkeit von der Konzentration an **I·II** (blaue Linie). Durch Zugabe des verlängerten Peptids **III** wird Komplex **I·II** aufgebrochen und die Interaktion zwischen **RP** und Syk wiederhergestellt. Die Rekonstitution kann nur in dem Maße erfolgen, wie die Bindungsaffinität des monovalenten Systems **I + III·II** es zulässt (Kontrollmessung, graue Linie).

5.1) Zusammenfassung

gebunden, wenn es bivalent präsentiert wurde (ca. 1 μM am Coiled-Coil-System **I·II**) und mit geringer Affinität, wenn der Ligand monovalent vorlag (ca. 11 μM für das Kontrollsystem **I** + **II·III**). In einem Fluoreszenzanisotropie-Assay wurde der Wechsel von bi- zu monovalent demonstriert: Wurde das fluoreszente Referenz-Peptid **RP** an Syk gebunden, so führte die Bildung des **RP**·Syk-Komplex zu einer hohen Anisotropie. Wurde nun eine bestimmte Konzentration an **I·II** hinzugegeben (z.B. 4 μM in Abb. 83B), so wurde ein Teil von **RP** verdrängt und ein Sinken der Anisotropie beobachtet. Wurde anschließend durch Zugabe von **III** der Komplex **I·II** aufgebrochen, wurde das monovalente System wiederhergestellt und ein Anstieg der Anisotropie gemessen, bis ein Äquivalent an **III** erreicht war. Damit konnte die Anwendung dynamischer Coiled-Coil-Systeme zur Kontrolle über das Bindungsverhalten eines Proteins gezeigt werden. Da die vorgestellte Methode die Schaltbarkeit auf Grundlage von rein peptidischen Strukturen und damit exprimierbaren Komponenten erlaubt, kann sie potenziell zur Regulation in lebenden Zellsystemen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurden Konzepte gezeigt, die auf Grundlage von PNA·DNA- und Coiled-Coil-Strukturen verschiedene Anwendungen im proteinbiologischen Bereich ermöglichen. Die folgenden Meilensteine wurden dafür erreicht:

- i) Synthese und Evaluation von Coiled-Coiled-basierten Donoren für die Markierung von Proteinen mit PNA
- ii) Erzeugung kovalenter PNA-Rezeptor-Konjugate auf der Oberfläche lebender Zellen
- iii) Anwendung des *PNA-tags* zur selektiven Markierung über PNA und DNA mit verschiedenen Fluorophoren an hY₁R, hY₂R und EGFR
- iv) Rekrutierung verzweigter DNA-Strukturen zur Erhöhung der Helligkeit
- v) gezielte Steuerung der EGFR-Dimerisierung durch Zugabe verbrückender Cy3-DNA bei gleichzeitiger Visualisierung des Rezeptors (Phosphorylierung und Internalisierung konnten damit verstärkt werden)
- vi) Parallelisierung des Coiled-Coil-vermittelten Fluorophortransfers durch orthogonale Peptidpaare zur Markierung von Rezeptoren
- vii) Kontrollierte Schaltung der Coiled-Coil-Bindung und Anwendung in der Aktivierung / Deaktivierung der Bindung der Syk-Kinase.

5.2) Ausblick

Der PNA-tag als Modul zur Markierung und Organisation von Rezeptoren auf lebenden Zellen zeigt ein enormes Potential in der Untersuchung und Manipulation von biologischen Systemen. Es ist nur konsequent dieses Potential in weiteren Anwendungen zu nutzen. Beispielsweise ist die Bildung höher geordneter Cluster von EGF-Rezeptoren Bestandteil aktueller Forschung. Die Abhängigkeit der Autophosphorylierung von solchen Strukturen und der Einfluss auf die Art der zellulären Antwort sind weiterhin nicht vollständig klar. Die Anwendung beispielsweise tetravalenter DNA-Architekturen in verschiedenen Abständen und Flexibilitäten könnte genutzt werden, um den Effekt solcher Cluster von anderen EGFR-Oligomeren gezielt abzugrenzen. So kann jede Art der Clusterbildung untersucht werden. Zudem lässt sich das Konzept des PNA-Transfers mit der Idee der orthogonalen Donor-Peptide verbinden. Die Installation mehrerer verschiedener PNA-Sequenzen auf verschiedenen Proteinen würde es ermöglichen die Interaktion verschiedener Rezeptoren gleichzeitig zu Visualisieren und zu steuern. Interessant ist dies beispielsweise für den HER2-Rezeptor, welcher über keinen bekannten kanonischen Liganden verfügt, wohl aber mit den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie wechselwirkt. Als klinisch relevanter Tumormarker für Mammakarzinome ist die genaue Kenntnis über die Wirkweise und Aktivierung von HER2 von zentraler Bedeutung. Die gezielte Verbrückung und inhibierte Heterodimerisierung von HER2 mit EGFR über PNA-DNA-Gerüste kann neue Erkenntnisse liefert, die potentere Tumorthérapien erlauben. Dieses Zusammenspiel von EGFR und HER2 soll in einer Folgestudie von M.Sc. Georgina Gavins in der Arbeitsgruppe Prof. O. Seitz untersucht werden.

Der PNA-tag kann zudem genutzt werden, um das Spektrum der Auslesemöglichkeiten zu erweitern. Besonders helle Fluorophore können für die hochauflösende Mikroskopie genutzt werden. Alternativ kann der PNA-tag eine verlängerte DNA-Sequenz rekrutieren, welche einen kürzeren DNA-Strang mit einem umgebungssensitiven Fluorophor bindet. Werden die DNA-Sequenzen so gewählt, dass die Hybridisierung und Dehybridisierung ein „Blinken“ erzeugt, kann der PNA-tag für hochauflösende Methoden wie DNA-PAINT genutzt werden. Damit könnte diese Methode auch ohne große und in der Erzeugung arbeitsintensive DNA-Antikörper-Konjugate auskommen. Auch können funktionelle Gruppen über die DNA rekrutiert werden, die andere Auslesemöglichkeiten als Fluoreszenz, wie etwa PET (Positronen-Emissions-Tomographie), MRI (Magnet-Resonanz-Visualisierung) oder zelluläre Raman-Spektroskopie ermöglichen.

Erste Experimente am Endothlin-System mit den genannten C-P2(E)-ET_AR- und C-P1(E)-ET_BR-Mutanten, welche von M.Sc. Philipp Wolf in der Gruppe von A.G. Beck-Sickinger (Universität Leipzig) durchgeführt wurden zeigen, dass eine selektive Markierung dieser GPCRs möglich ist.

5.2) Ausblick

Im weiteren Verlauf sollen Fluorophore mit besserer Photostabilität als Coumarin343 und höherer Helligkeit als TMR an den Donorpeptiden verwendet werden und zudem Zelllinien mit stabiler Expression der Rezeptormutanten generiert werden. Die optimierten Farbstoffe und Expressionssysteme können dann genutzt werden, um zeitaufgelöst die Interaktion der beiden Rezeptoren bei Stimulation durch Endotheline zu verfolgen. Dabei können speziell die Rezeptoren, die zuvor membranständig waren und internalisiert wurden von neu in der Zelle synthetisierten unterschieden werden. Dies würde neue Erkenntnisse über die vaskuläre Regulation geben.

5.2) Ausblick

6) Experimenteller Teil

6.1) Materialien

6.1.1) Reagenzien

Die Fmoc-geschützten Aminosäuren für die Peptid-Festphasensynthese wurden von folgenden Firmen bezogen: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(trt)-OH von *BIOSOLVE*; Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH von *Carbolution*; Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH von *Iris Biotech*; Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH von *Novabiochem*. Die Fmoc-Aminosäuren mit besonders säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen für die Herstellung von PNA-Sulfonat-Peptid-Konjugaten Fmoc-Lys(Mmt)-OH und Fmoc-Glu(PhiPr)-OH wurden bei *Iris Biotech* und *Novabiochem* gekauft. Für die Fmoc-basierte PNA-Synthese wurden die Monomere Fmoc-a(Bhoc)-OH, Fmoc-c(Bhoc)-OH, Fmoc-g(Bhoc)-OH und Fmoc-t-OH von *Link Technologies* bezogen. Die PNA-Synthese nach Boc-Strategie wurden mit den Monomeren Boc-a(Cbz)-OH, Boc-c(Cbz)-OH, Boc-g(Cbz)-OH und Boc-t-OH von *ASM Research Chemicals* durchgeführt. Das Monomer für den Einbau flexibler Diethylenglycoleinheiten Fmoc-O2Oc-OH wurde von *Iris Biotech* bezogen.

Tentagel-Rinkamid- (TGR)-Harz wurde von *RAPP Polymers* mit einer Beladung von ca. 0.2 mmol/g bezogen. Besonders säurelabiles Sieber-Amid-Harz und 4-Methylbenzylhydramin-(MBHA)-Harz für die Synthese nach Boc-Strategie wurden bei *NovaBioChem* mit einer Beladung von 0.65 mmol/g (Sieber-Amid) und 0.67 mmol/g (MBHA, 100 – 200 mesh) gekauft.

Die Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen *Carl Roth* (PyBOP, HCTU, HATU, HOBT, EDC·HCl), *Carbolutions* (Oxyma) und *Angene* (HOBT) bezogen. Weitere Reagenzien wurden bei *Carl Roth* (TFA, Triethylamin, Pyridin), *Acros Organics* (2,6-Lutidin, m-Kresol), *Sigma Aldrich* (TIS, TCEP), *Alfa Aesar* (Piperidin, DIPEA), *TCI* (TFMSA) *VWR Chemicals* (Essigsäureanhydrid) und *Fisher Bioreagents* (NMM) gekauft. Die verwendeten Fluorophore wurden bei *Sigma Aldrich* (5,6-Carboxyfluorescein, Coumarin343) und *ChemPep Inc.* (5,6-Carboxytetramethylrhodamin) erworben.

Für die verwendeten Puffer wurden Reagenzien von *Carl Roth* (Borsäure, Glycin, Magnesiumchloridhexahydrat, Guanidiniumhydrochlorid, Triton™ X-100, EDTA, Phosphorsäure 85%-ig), *Fisher Bioreagents* (Tris), *VWR Chemicals* (Natriumchlorid), *Merck* (Natriumhydrogenphosphat, Tween-20 Polysorbat), *Iris Biotech* (Dithiotreitol), *Sigma Aldrich* (SDS, Glycerol) bezogen.

Weitere verwendete Bausteine wurden nach literaturbekanntem Vorgehen hergestellt von Dr. Gerbrand van der Heden van Noort (ALO)^[341], Gunnar Bachem (Fmoc-pTyr(NMe₂)₂-OH)^[342], Nadin Troitzsch (Fmoc-Lys(DabcyI))^[343] und Pablo Lores Lareo (S-Trt-Mercaptopropionsäure und Fmoc-Glycin-vorbeladenes MBHA-Harz). Das Protein Syk wurde wie beschrieben von Christina Klotz exprimiert und aufgereinigt.^[162] Das Kontrollpeptid **38** wurde von Dr. Robert Zitterbart und das GC-E3-Peptid **37** von Dr. Ulrike Reinhardt zur Verfügung gestellt.

6.1.2) Lösungsmittel und Materialien für die Chromatographie

DMF für Festphasensynthese sowie Acetonitril für die Umkehrphasenchromatographie wurden von *VWR Chemicals* jeweils in einer Reinheit von 99.9% bezogen. Methanol für den Transfer auf die Nylonmembran für Western Blots wurde in der Reinheit *blotting grade* von *Carl Roth* bestellt. Wasser für HPLC, UPLC™, Puffer und wässrige Lösungen wurde aus der Reinstwasser-Aufbereitungsanlage *Astacus LifeScience* von *Membrapure* verwendet.

Dünnschichtchromatographie:

Der Reaktionsverlauf wurde über Dünnschichtchromatographie auf Silikagel-beschichteten Dünnschichtplatten Typ 60-F₂₅₄S (0.2 mm Schichtdicke) von *Merck* überprüft. Die Detektion erfolgte über UV-Anregung bei $\lambda = 254$ nm für aromatische Verbindungen, mit Ninhydrin (300 mg in 100 mL Butanol, 3 mL Essigsäure), Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat, 2.5 g Molybdatophosphorsäure, 94 mL Wasser, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure) oder Permanganatlösung (0.05% KMnO₄ in wässriger Lösung).

Säulenchromatographie:

Säulenchromatographische Trennungen wurden bei erhöhtem Druck durch Druckluft an Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 0.032 – 0.063 mm) durchgeführt.

6.1.3) Oligonukleotide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma *Biomers* bezogen. Oligonukleotide mit fluoreszenter Markierung oder einer Länge von über 20 Nukleotiden wurden über HPLC aufgereinigt bestellt. Andernfalls wurde allein über eine Kartusche entsalzt. Die Oligonukleotide wurden in Wasser aufgenommen und über UV/vis-Spektroskopie in DNA-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) quantifiziert. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 260$ nm wurden über den OligoAnalyzer 3.1 von *idt* ermittelt. Bei fluoreszent markierten Oligonukleotiden wurden die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe bei

6) Experimenteller Teil

bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ nachträglich addiert: $\epsilon_{\text{Cy3}} = 4,930 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{\text{Cy5}} = 10,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{\text{FAM}} = 20,960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$.

Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurden zwei Vektoren verwendet: 1) EGFR-eGFP ohne Cysteinyl-E3-*tag* oder 2) C-E3-EGFR-eGFP für den PNA-Transfer. Erster wurde freundlicherweise von Dr. Donna Arndt-Jovin (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt (siehe Vektorkarte im Anhang, Kapitel 7.3.1). Der zweite Vektor wurde aus dem ersten erzeugt, indem der für die Transferreaktion benötigte *tag* zur Klonierung in Auftrag gegeben wurde bei *GenScript* (Piscataway, NJ, USA). Die entsprechende Nukleotidsequenz **IV**, die für die Peptidsequenz **III** kodiert, wurde zwischen Signalpeptid **I** (755 – 827) und dem N-Terminus des EGFR eingefügt. Dies erfolgte über Schneiden des ursprünglichen Vektors EGFR-eGFP durch *NheI* an der Erkennungssequenz GCTAGC (591 – 596) und *BglII* an der Sequenz AGATCT (3519 – 3524) und anschließende gerichtete Mutagenese über entsprechende Primer. Der modifizierte Sequenzabschnitt wurde nachfolgend in den ursprünglichen Vektorrest ligiert.

Beide Vektoren, EGFR-eGFP und C-E3-EGFR-eGFP, wurden nach dem Erhalt amplifiziert, isoliert und die korrekte Amplifikation überprüft. Hierfür wurde der jeweilige Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *BglII* geschnitten, die Größe der resultierenden Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese untersucht und mit den erwarteten Abschnitten abgeglichen. Die Vektorkarten zu den Vektoren und den darin vorhandenen Schnittstellen wurden mit SnapGene Viewer 3.0.3 erstellt (siehe Kapitel 7.3.1).

Signalpeptid (**I**) (N → C):

MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRA

DNA-Sequenz des Signalpeptids(**II**) (5' → 3'):

ATG CGA CCC TCC GGG ACG GCC GGG GCA GCG CTC CTG GCG CTG CTG GCT GCG CTC TGC CCG
GCG AGT CGG GCT

Eingefügte Peptidsequenz (**III**) (N → C):

C E I A A L E K E I A A L E K E I A A L E K G G

Eingefügte DNA-Sequenz (**IV**) (5' → 3'):

TGC GAG ATC GCC GCC CTG GAG AAG GAG ATC GCC GCC CTG GAG AAG GAG ATC GCC GCC CTG
GAG AAG GGC GGC

6.1.4) Materialien für biochemische Arbeiten

Die für Bradford-Assay, Gelelektrophorese und Western Blots benötigten Materialien und Reagenzien wurden von den Firmen *Carl Roth* (Phosphorsäure 85%, RotiphoreseGel 40®, Milchpulver *blotting grade*), *Sigma Aldrich* (Ammoniumpersulfat, Triton™ X-100, Glycerol), *Acros*

6) Experimenteller Teil

Organics (TEMED) und *Fluka* (Coomassie Brilliant Blue) bezogen. Als Membran wurde eine Nitrocellulosemembran mit 0.45 µm Porengröße von Whatman® verwendet.

Für Dimerisierungsexperimente verwendete Reagenzien stammen von *Thermo Fisher Scientific* (Lipofektamin® 2000) und *Sigma Aldrich* (poly-D-Lysin Hydrobromid, Mwt 70,000 – 150,000).

Der Farbstoff zur Zellkernfärbung Hoechst33342 stammt von *life technologies*.

Der rekombinant hergestellte Wachstumsfaktor hEGF wurde von *Peprotech* (Rocky Hill, NJ, USA) bezogen. Bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V) zur Herstellung von Puffern und Kalibrierreihen wurde in einer Reinheit von >98% bei *Carl Roth* gekauft. Die Additive für RIPA-Lysepuffer PhosSTOP und complete protease blocker wurden jeweils von *Sigma Aldrich* und *Roche* bezogen. Normales Ziegenserum wurde gekauft bei *New England Biolabs*. Alle verwendeten Antikörper (EGF Receptor (D38B1) XP® Rabbit mAb, Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5) XP® Rabbit mAb, β-Tubulin Rabbit mAb, anti-Rabbit-IgG HRP-verknüpfter Antikörper, anti-Rabbit-IgG AF647-verknüpfter Antikörper) stammen von Cell Signalling und wurden in den nach Herstellerprotokoll angegebenen Verdünnungen verwendet. Für SDS-PAGE wurde die Proteinleiter PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 - 180 von *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Die für die Zellkultur verwendeten Medien (DMEM und Opti-MEM®) sowie die Zusätze (FBS) wurden von *Gibco* (*Thermo Fisher Scientific*) erworben. Die Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS) wurde von *Alfa Aesar* bezogen.

6.1.5) Puffer

Tabelle I

| Puffer | Anwendung | Zusammensetzung |
|-----------------|-------------------------------|---|
| Transferpuffer7 | Transferreaktionen | 100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0 |
| Transferpuffer8 | Transferreaktionen | 100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8.0 |
| DNA-Puffer | DNA-PNA-Anwendungen | 100 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0 |
| TB-Puffer | native PAGE (Laufpuffer) | 89 mM Tris, 89 mM H ₃ BO ₃ , 1 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 150 mM NaCl |
| SDS-Puffer | SDS-PAGE (Laufpuffer) | 3.02 g/L Tris, 15 g/L Glycin, 1 g/L SDS |
| Ladepuffer I | Beladung nativer Gele | 4% 5x-TB-Puffer, 50% Glycerol |
| Ladepuffer II | Beladung denaturierender Gele | 100 mM Tris, 4% SDS, 20% Glycerol, 200 mM DTT, 0.1% Bromphenolblau |
| WB-Puffer | Western Blot (Transferpuffer) | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol |
| Ligationspuffer | NCL von Peptid und PNA | 200 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM TCEP, 20 mM Thiophenol, pH 7.5 |

6) Experimenteller Teil

| | | |
|------------------------------|---|--|
| Ak-Puffer I | Antikörperinkubation | 5% BSA, 0.1% Tween-20 in TBS |
| Ak-Puffer II | Antikörperinkubation | 5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in TBS |
| Ak-Puffer III | Antikörperinkubation | 1% BSA, 0.3% Triton™ X-100 in TBS |
| RIPA | Zelllysis / Grundlagenpuffer | 150 mM NaCl, 1% Triton™ X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris |
| RIPA ^{completeSTOP} | Zelllysis | RIPA, PhosSTOP, complete protease blocker* |
| PBS | Grundlagenpuffer | 144 mg/L KH ₂ PO ₄ , 9 g/L NaCl, 795 mg/L Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, pH 7.4 |
| TBS | Grundlagenpuffer | 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0 |
| TBS0.05% | Western Blot (Waschpuffer) | 0.05% Tween-20 in TBS |
| Blockierungspuffer I | Membranblockierung | 5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in TBS |
| Blockierungspuffer II | Blockierung von <i>well</i> -Platten | 5% normales Ziegen Serum, 0.3% Triton™ X-100 in PBS |
| Syk-Puffer | Bindungsstudien über Fluoreszenzanisotropie | 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA |
| Bradford-Reagenz | kolorimetrische Proteinquantifikation | 10% Phosphorsäure (85%-ig), 5% Ethanol, 0.01% Coomassie Brilliant Blue |
| DPBS | GPCR-Markierung | 200 mg/L KCl, 200 mg K ₂ HPO ₄ , 8 g/L NaCl, 1.15 g/L Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2 – 7.7 |
| HBSS | GPCR-Markierung | 400 mg/L KCl, 60 mg K ₂ HPO ₄ , 350 mg/L NaHCO ₃ , 8 g/L NaCl, 48 mg/L Na ₂ HPO ₄ , 1 g/L D-Glucose, pH 6.7 – 7.8 |

* Anwendung nach Herstellerangabe

6.2) Geräte

Präparative und semi-präparative HPLC:

Die HPLC-Aufreinigung in semi-präparativem und präparativem Maßstab wurde an einem Gerät der Serie 1100 von *Agilent Technologies* durchgeführt unter Verwendung von UV-Detektion bei den Wellenlängen von $\lambda = 210$ nm und $\lambda = 260$ nm. Als stationäre Phase diente für die präparative Anwendung (Aufreinigung der Proteine EGF, TGF α und derer Derivate) die Säule Gravity C18 (5 μ m, 250 x 21, Porengröße: 220 Å) von *Varian*. In semi-präparativem Maßstab (Peptide und PNA-Oligomere unter 10 μ mol) wurde eine Polaris C18-Säule (5 μ m, 250 x 10, Porengröße: 220 Å) von *Varian* verwendet. Das Laufmittel setzte sich als Gemisch aus Lösungen A (98.9% Wasser, 1.0% ACN, 0.1% TFA) und B (98.9% ACN, 1.0% Wasser, 0.1% TFA)

6) Experimenteller Teil

zusammen. Unter einer Flussrate von 15 mL/min bzw. 6 mL/min wurden die Laufmittelgemische gepumpt und dabei die im Anhang angegebenen Gradienten verwendet.

Analytische HPLC-MS:

Die Produktanalyse durch HPLC-MS wurde an einem Gerät von *Agilent Technologies* der Serie 1100 durchgeführt. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte durch einen Quadrupol-Analysator mit Elektronenspray-Ionisation (ESI), die Detektion während der Chromatographie durch einen UV-Detektor bei wahlweise $\lambda = 210$ nm oder $\lambda = 260$ nm. Als Trennsäule wurde eine Polaris C18 (3 μm , 100 x 2, Porengröße: 220 Å) von *Macherey & Nagel* bei einer Temperatur von 50 °C verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch der Lösungen C (98.9% Wasser, 1.0% ACN, 0.1% Ameisensäure) und D (98.9% ACN, 1.0% Wasser, 0.1% Ameisensäure), welches mit der Flussrate von 0.3 mL/min gepumpt wurde.

UPLCTM-MS:

Die Produktanalyse erfolgte neben der HPLC-MS hauptsächlich über UPLCTM-MS an der Acquity von *Waters*. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte durch einen Quadrupol-Analysator mit Elektronenspray-Ionisation (ESI); die Detektion durch einen DAD-Detektor wobei die Wellenlängen bei $\lambda = 210$ nm und $\lambda = 260$ nm hauptsächlich betrachtet wurden. Als Trennsäule wurde eine Acquity UPLCTM C18-Trennsäule (1.7 μm , 50 x 2.1 mm) von *Waters* bei einer Temperatur von 55 °C verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch der Lösungen A (98.9% Wasser, 1.0% ACN, 0.1 %TFA) und B (98.9% ACN, 1.0% Wasser, 0.1% TFA), welches mit der Flussrate von 0.5 mL/min gepumpt wurde.

UPLCTM:

Die zeitabhängige Reaktionsbeobachtung erfolgte an der UPLCTM Acquity von *Waters*. Die Detektion erfolgte zumeist bei $\lambda = 260$ nm, alternativ bei $\lambda = 210$ nm. Als Trennsäule wurde die Acquity UPLCTM C18-Trennsäule (1.7 μm , 50 x 2.1 mm) von *Waters* bei einer Temperatur von 55 °C verwendet. Das Laufmittel setzte sich als Gemisch aus Lösungen E (99.9% Wasser, 0.1% TFA) und B (98.9% ACN, 1.0% Wasser, 0.1% TFA) zusammen und wurde mit einer Flussrate von 0.5 mL/min gepumpt.

HPLC mit Fluoreszenz-/ DAD-Detektion:

Zur zeitabhängigen Analyse von Reaktionsverläufen und Aufreinigung von Produkten in nanomolarer Menge wurde die HPLC Elite LaChrom von *Merck-Hitachi* verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer Polaris C18-Trennsäule (Polaris 5 C18-A 100 x 4.6 zur Aufreinigung oder Polaris 5 C18-A 250 x 4.6 für zeitabhängige Analysen) von *Agilent Technologies* mit einer Flussrate von 0.8 mL/min bei einer Temperatur von 55 °C. Als mobile Phase wurde ein Gemisch

6) Experimenteller Teil

aus Lösungen A (98.9% Wasser, 1.0% ACN, 0.1% TFA) und B (98.9% ACN, 1.0% Wasser, 0.1% TFA). Zur Detektion wurde die Photodiodenzeile Elite LaChrom L-2450 von *Merck Hitachi* verwendet mit einem spektralen Messbereich von 200 – 350 nm. Zur Fluoreszenzdetektion wurde der Detektor Elite LaChrom L-2480 mit Xenon-Gasentladungslampe verwendet. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die verwendeten Farbstoffe wurden wie folgt eingestellt:

| | | |
|---------|--|--|
| TMR: | $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$ |
| Cou343: | $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$ |

Gefriertrocknung:

Wässrige Lösungen / Lösungsgemische wurden am Alpha 2-4 von *Christ* entfernt.

MALDI-TOF:

Die Massenspektrometrie wurde am *Shimadzu Biotech* Axima Confidence in linearem Modus durchgeführt. Die Ionisation erfolgte durch einen Stickstofflaser. Es wurden jeweils 10 Profile aus je 50 Schüssen zu einem Spektrum verrechnet bei einer relativen Laserintensität von ca. 90 in linear-positivem Messmodus. Als Matrix wurde eine Sinapinsäurelösung der Konzentration 10 mg/mL in Acetonitril : H₂O = 1 : 1 mit 0.1% TFA verwendet. Sinapinsäure wurde von *Acros Organics* bezogen.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR):

Die ¹H- und ¹³C-Spektren wurden am *Bruker Avance II 300* oder *Bruker Avance II 500* aufgenommen. Zur Auswertung wurde die Software *MestreC 4.8.6.0* verwendet und die chemischen Verschiebungen δ in ppm angegeben. Die Signale des jeweils deuterierten Lösungsmittels CDCl₃ wurden genutzt, um eine Kalibrierung durchzuführen (¹H 7.26 ppm(s), ¹³C 77.0 ppm(t)). Das deuterierte Lösungsmittel wurde von *deutero* bezogen. Die Signal-multiplizität wird wie folgt angegeben: s – Singulett, d – Dublett, t – Triplett, m – Multiplett, br – verbreitertes Signal.

Fluoreszenzspektrometrie:

Experimente zu Fluoreszenz und Fluoreszenz-Quenching wurde am Carey Eclipse von *Varian* durchgeführt. Dafür wurden Quarzglasküvetten der Firma *Hellma* mit 1 cm Schichtdicke und 1 mL Arbeitsvolumen verwendet, die vor den Messungen mit 1%-iger Hellmanex III Reinigungslösung, Wasser und Methanol gereinigt wurden. Die verwendeten Puffer wurden vor jeder Messung entgast, indem sie unter vermindertem Druck für mindestens 30 min gerührt wurden. Folgende Anregungs- und Auslesewellenlängen wurden gewählt:

| | | |
|------|--|--|
| FAM: | $\lambda_{\text{ex}} = 485 \pm 5 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 5 \text{ nm}$ |
|------|--|--|

6) Experimenteller Teil

Datenpunkte wurden alle 12 s mit einer Messzeit von 1 s aufgenommen und die Temperatur konstant bei 25 °C (Peptid- Verdrängung) bzw. 37 °C (PNA-DNA-Verdrängung) gehalten.

UV/vis-Spektrometrie:

Denaturierungsexperimente wurden am Carey 100 Bio von *Varian* durchgeführt. Dafür wurden Quarzglasküvetten der Firma *Hellma* mit matten Seiten, einer Schichtdicke von 1 cm und einem Fassungsvermögen von 1 mL mit Deckel verwendet und vor den Messungen mit 1%-iger Hellmanex III Reinigungslösung, Wasser und Methanol gereinigt. Die Puffer wurden vor jeder Messung entgast, indem sie unter vermindertem Druck für mindestens 30 min gerührt wurden. Zur Quantifikation von PNA- und DNA-Oligomeren sowie einiger Peptide wurde der NanoDrop ND-1000 von *peqlab* mit einem Probenverbrauch von 2 µL je Messung und einer Schichtdicke von 0.1 cm verwendet. Peptide, die bei $\lambda = 214$ nm quantifiziert wurden, wurden am UV/vis-Spektrometer SmartSpec Plus von *Biorad* unter Verwendung von Halbmikro-Quarzglasküvetten der Firma *Hellma* mit matten Seiten, einer Schichtdicke von 1 cm und einem Fassungsvermögen von 1 mL gemessen.

Fluoreszenzanisotropie:

Anisotropiemessungen zur Peptid-Strangverdrängung wurden am SPEX Fluoromax-3 Spektrofluorometer von *Horiba* mit Peltier-wärmegeregeltem Einzellenhalter bei 25 °C durchgeführt. Es wurde jeweils eine Suprasil-Quarzglasküvette Typ 105.251-QS von *Hellma* verwendet und diese vor jeder Messungen mit 1%-iger Hellmanex III Reinigungslösung, Wasser und Methanol gereinigt. Bei Verwendung des FAM-Fluorophors erfolgte die Anregung bei $\lambda = 485$ nm und das Auslesen bei $\lambda = 525$ nm im 90°-Winkel. Die Schlitzbreite wurde jeweils so eingestellt, dass die Photonenzahl am Detektor bei $> 10^5$ Zählern lag und der gerätespezifische G-Faktor als $G = 0.64$ festgesetzt. Der verwendete Puffer wurde vor jeder Messung entgast, indem er unter vermindertem Druck für mindestens 30 min gerührt wurde.

Fluoreszenzmessungen am Plattenlesegerät:

Immunofluoreszenzmessungen wurden am Victor X5 Multimode Plate-Reader von *Perkin Elmer* durchgeführt. Dafür wurden sterile, für die Zellkultur vorbehandelte 96-well-Platten CulturePlate-96 (schwarz) von *Perkin Elmer* genutzt und die Fluoreszenz in einem Abstand von 4 mm vom Plattenboden von oben gemessen. Für die jeweiligen Fluorophore wurden folgende Filter gewählt:

| | | |
|--------|---------------------------------------|---------------------------------|
| GFP: | $\lambda_{\text{ex}} = 480 \pm 31$ nm | $\lambda_{\text{em}} > 535$ nm |
| AF647: | $\lambda_{\text{ex}} = 640 \pm 10$ nm | $\lambda_{\text{em}} > 665$ nm. |

6) Experimenteller Teil

Es wurde jeweils zunächst das GFP-Signal mit einer Messdauer von 0.1 s, anschließend das AF647-Signal mit einer Messdauer von 0.1 s aufgezeichnet. Während der Messungen wurde der Deckel von der Platte entfernt.

Absorptionsmessungen am Plattenlesegerät:

Für Absorptionsmessungen im Plattenformat wurde das Gerät POLARstar Optima von *BMG Labtech* verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Bradford-Assay wurden durchsichtige 96-well-Platten von *TPP* verwendet und die Absorption bei $\lambda = 580$ nm bestimmt.

Fluoreszenz- und Lumineszenz-Bildgebung von Gelen und Membranen:

Gele mit fluoreszenten Komponenten sowie das lumineszenzbasierte Auslesen von Western Blot-Membranen wurde an der Image Station MM Pro von *Kodak* vorgenommen. Für ersteres wurden folgende Filter verwendet:

Cy3/TMR: $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm.

Lumineszenz wurde in einem Zeitraum von 30 s aufgenommen mit einem binning von 4 x 4. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte im Programm ImageJ.

Fluoreszenzmikroskopie:

Für erste Versuche zum Transfer von Fluorophoren und zur Zwei-Schritt-Markierung sowie als Transfektionskontrolle wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer A.1 mit der Kamera AxioCam MRm von *Zeiss* verwendet. Aufnahmen wurden mit einem Objektiv in 20-facher Vergrößerung durchgeführt und mit der Software AxioVision 4.8.2 ausgewertet. Zunächst wurden die Zellen im Durchlicht aufgenommen, dann unter Verwendung der entsprechenden Filter der gewünschte Reflektionsmodus genutzt. Die Filter der Kanäle entsprechen dabei den folgenden Wellenlängen:

GFP: $\lambda_{\text{ex}} = 470 \pm 40$ nm $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 50$ nm

Cy3/TMR: $\lambda_{\text{ex}} = 545 \pm 25$ nm $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 70$ nm

Cy5: $\lambda_{\text{ex}} = 640 \pm 30$ nm $\lambda_{\text{em}} = 690 \pm 50$ nm.

Außer der Färbung des Schwarzweiß-Rohbilds in die entsprechende Emissionsfarbe (GFP – grün, Cy3/TMR – rot, Cy5 – magenta) wurde keine Nachbearbeitung vorgenommen. Die Belichtungszeiten wurden je nach Filter und Experimentset zwischen 40 und 200 ms gewählt, jedoch immer konstant innerhalb einer Experimentreihe gehalten, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Höher aufgelöste Fluoreszenzmikroskopie wurden am Inversmikroskop IX83 von *Olympus* mit der Anregung durch eine coolLED pE-4000 Einheit und der Kamera ORCA-flash 4.0 von *Hamamatsu* aufgenommen. Zunächst wurde der Fokus bei Vergrößerung mit 10-fach-Objektiv

6) Experimenteller Teil

eingestellt, dann die Messung mit 60-fachem Objektiv unter Verwendung von Immoil-F30CC vorgenommen. Als Träger wurden 8-well μ -slides mit der Beschichtung ibiTreat® von *ibidi* verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Software CellSense Dimension von *Olympus* vorgenommen und die Einstellungen (Einschränkung des Intensitätsfensters und zum Teil Kontrast und Helligkeit) entlang einer Experimentreihe konstant gehalten. Folgende Anregungs- und dichroistische Emissionsfilter von der Firma *Semrock* wurden genutzt und mit folgenden Belichtungszeiten je Kanal gemessen:

| | | | |
|-------------|---|---|--------------------------|
| Durchlicht: | | | Belichtungsdauer: 117 ms |
| DAPI: | $\lambda_{\text{ex}} = 350 \pm 50 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 50 \text{ nm}$ | Belichtungsdauer: 10 ms |
| YFP: | $\lambda_{\text{ex}} = 500 \pm 24 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} > 520 \text{ nm}$ | Belichtungsdauer: 1 s |
| TRITC: | $\lambda_{\text{ex}} = 575 \pm 25 \text{ nm}$ | $\lambda_{\text{em}} > 593 \text{ nm}$ | Belichtungsdauer: 5 s. |

Die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurden als Z-Stapel-Aufnahmen mit einer Schrittgröße von $0.27 \mu\text{m}$ in Z-Richtung angefertigt und neun Bilder aus den Kanälen Durchlicht, DAPI, YFP und TRITC, also 36 Einzelaufnahmen über Wiener-Dekonvolutionsmethode zu einem rauscharmen Bilder verrechnet.

6.3) Allgemeine Arbeitsprotokolle

6.3.1) Manuelle Peptidsynthese

6.3.1.1) Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie

Die manuelle Peptidsynthese erfolgte an TGR-Harz mit Fmoc-geschütztem Amin und einer Beladung von ca. 0.2 mmol/g . Eine entsprechende Harzmenge wurde in einen Spritzenreaktor eingewogen und das Harz vor der Synthese für mindestens 30 min in DMF gequollen. Der erste Entschützungs-schritt wurde jeweils für das *Fmoc-Monitoring* genutzt und der ermittelte Wert zur Berechnung der Ausbeute verwendet.

Entschützung:

Das Harz wurde zwei Mal für je 1.5 min mit einer Mischung aus DMF : Piperidin (4 : 1) behandelt. Es folgten Waschschrirte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Kupplung:

Protokoll I: Dieses Protokoll wurde als allgemeiner Standard für die Synthese von Peptiden genutzt. 4 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 4 Äq. Oxyma, 3.6 HCTU und 8 Äq. DIPEA wurden in DMF gelöst. Das Volumen an DMF wurde in Abhängigkeit von der Löslichkeit der

6) Experimenteller Teil

Aminosäure so gering wie möglich gehalten, um eine hohe Konzentration der Reaktanden zu erhalten. Es wurden dennoch nie weniger als 100 µL Reaktionslösung verwendet. Diese Mischung wurde für 30 min mit dem Harz zur Reaktion gebracht. Ab der 10. Aminosäure wurden Doppelkupplungen durchgeführt. Es folgten Waschschrte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Protokoll II: Dieses Protokoll wurde für möglicherweise anspruchsvolle bzw. lange Peptide, z.B. die Kupplung des Peptid-Liganden KpYETLG-(Deg)_{1/3} verwendet. 4 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 4 Äq. Oxyma, 3.6 HCTU und 8 Äq. DIPEA wurden in DMF gelöst. Das Volumen an DMF wurde in Abhängigkeit der Löslichkeit der Aminosäure so gering wie möglich gehalten, um eine hohe Konzentration der Reaktanden zu erhalten. Es wurden dennoch nie weniger als 100 µL Reaktionslösung verwendet. Diese Mischung wurde für 20 min mit dem Harz zur Reaktion gebracht. Die Kupplungen wurden je 3-fach vorgenommen. Es folgten Waschschrte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Protokoll III: Die Kupplung von 5,6-Carboxyfluorescein (FAM) wurde mit 4 Äq. FAM, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in DMF für je 20 min als Doppelkupplung vorgenommen. Daraufhin wurde das Harz gewaschen: fünf Mal DMF, fünf Mal DMF : Piperidin (4 : 1), fünf Mal DMF und fünf Mal DCM.

Acetylierung:

Das Harz wurde mit einer Mischung aus Acetanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89) für 5 min behandelt. Anschließend wurde mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF gewaschen.

6.3.1.2) Synthese N-terminaler Thioester

Die Synthese der peptidischen MPA- und MPAA-Thioester mit Azidohexansäure bzw. Mmt-Glycin und den Fluorophoren TMR oder Coumarin343 wurde an TGR-Harz durchgeführt. Nach der Fertigstellung des geschützten Peptids nach beschriebenem Fmoc-Protokoll am Harz wurde das Mmt-geschützte Thiol (Mmt-MPA, Mmt-MPAA) gekuppelt, acetyliert und die Mmt-Schutzgruppe entfernt. Der Thioester wurde durch Kupplung einer Carbonsäure, Azidohexansäure oder Mmt-Glycin, an das Thiol generiert. Im Fall von Mmt-Glycin folgte ein weiterer Acetylierungs- und Entschützungschrte sowie die Kupplung des gewünschten Fluorophors.

Kupplung des Mmt-geschützten Thiols und Acetylierung:

4 Äq. Mmt-MPA oder Mmt-MPAA, 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM wurden mit dem freien N-Terminus des Peptids am Harz zur Reaktion gebracht. Nach der Doppelkupplung für je 30 min, wurde das Harz mit DMF, DCM, DMF gewaschen und nach Standard-Protokoll acetyliert. Anschließend wurde 5 Mal mit DMF und zehn Mal mit DCM gewaschen.

Entfernen der Mmt-Schutzgruppe:

Das Harz wurde zwei Mal für je 1 min mit DCM : TFA : TIS (96 : 2 : 2) behandelt. Es wurde anschließend zehn Mal mit DCM und fünf Mal mit DMF gewaschen.

Kupplung von Azidohexansäure bzw. Mmt-Glycin:

Es wurde ein Gemisch aus 4 Äq. der Carbonsäure mit 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM in DMF auf das Harz gegeben und für 30 min zur Reaktion gebracht. Dieser Schritt wurde als Doppelkupplung ausgeführt und anschließend das Harz mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF gewaschen. Im Fall von Mmt-Glycin folgte ein weiterer Acetylierungsschritt, die Entschützung der Mmt-Schutzgruppe und Kupplung des Fluorophors, bevor der Peptid-Thioester vom Harz freigesetzt wurde.

6.3.2) Automatisierte Peptidsynthese

6.3.2.1) Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie

Die Synthese in 10 µmol- bzw. 25 µmol-Maßstab wurde am MultiprepRS Synthesizer von *intavis* durchgeführt. Die entsprechende Menge TGR-Harz wurde in den Spritzenreaktor eingewogen und mindestens 30 min vor Beginn in DMF zum Quellen gebracht.

Entschützung:

Das Harz wurde einmal für 5 min und einmal für 3 min mit einer Mischung aus DMF : Piperidin (4 : 1) behandelt und drei Mal mit DMF gewaschen.

Kupplung:

Protokoll IV: Coiled-Coil-Peptide wurden unter Verwendung von 5 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 5 Äq. Oxyma, 4.5 Äq. HCTU und 10 Äq. NMM in DMF je Kupplungsschritt hergestellt. Dafür wurden Stammlösungen von 1) 0.4 M Fmoc-Aminosäure-Oxyma-Gemisch in DMF, 2) 0.4 M HCTU-Lösung in DMF und 3) 4 M NMM in DMF verwendet und jeweils kurz vor der Reaktion die jeweilige Reaktionsmischung hergestellt. Bis zur 8-ten Aminosäure wurden Einfachkupplungen mit je 30 min Reaktionszeit, bis zur 40-ten Aminosäure Zweifachkupplungen von je 20 min Reaktionszeit und von da an Dreifachkupplungen mit je 15 min Reaktionszeit durchgeführt. Das Harz wurde anschließend 3 Mal mit DMF gewaschen.

Protokoll V: Für die Synthese der Wachstumsfaktoren EGF und TGF α wurden Stammlösungen aus 1) 0.5 M Fmoc-Aminosäure-Oxyma-Gemisch in DMF, 2) 0.5 M HCTU-Lösung in DMF und 3) 4 M NMM in DMF) unter folgenden Kupplungsbedingungen verwendet: 8 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 8 Äq. Oxyma, 7.2 Äq. HCTU und 16 Äq. NMM in DMF je Kupplungsschritt. Die ersten

6) Experimenteller Teil

8 Kupplungen wurden einfach mit je 30 min Reaktionszeit, die Kupplungen bis zur 35-sten Aminosäure doppelt mit je 20 min Reaktionsdauer und von da an dreifach mit je 15 min Kupplungsdauer durchgeführt. Das Harz wurde anschließend 3 Mal mit DMF gewaschen.

Acetylierung:

Das Harz würde mit einer Mischung aus Acetanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89) für 5 min behandelt. Anschließend wurde es 3 Mal mit DMF gewaschen.

6.3.2.2) Synthese an besonders säurelabilem Sieber-Amid-Harz

Die Synthese in 2 µmol- bzw. 5 µmol-Maßstab wurde am ResPep Synthesizer von *intavis* durchgeführt. Das Harz mit einer Ausgangsbeladung von ca. 0.65 mmol/g wurde vor der Synthese runterbeladen. Dafür wurden 100 mg Harz in einen Spritzenreaktor eingewogen und 45 min gequollen. Anschließend wurden 20 µmol Fmoc-Gly-OH unter Verwendung von 20 µmol PyBOP und 40 µM NMM über Nacht gekuppelt. Das Harz wurde mit DMF, DCM, DMF gewaschen und die verbleibenden freien Amine nach üblichem Acetylierungsprotokoll umgesetzt. Die neue Beladung des Harzes mit Fmoc-Glycin wurde durch *Fmoc-Monitoring* kontrolliert. Vor der weiteren Umsetzung wurde das Harz jeweils 45 min in DMF gequollen.

Entschüttung:

Das Harz wurde zwei Mal für je 2 min mit einer Mischung aus DMF : Piperidin (4 : 1) behandelt. Anschließend wurde es 3 Mal mit DMF gewaschen.

Kupplung:

Protokoll VI: Aus den Stammlösungen von 1) 0.3 M Fmoc-Aminosäure-HOBt-Gemisch in DMF, 2) 0.6 M HCTU-Lösung in DMF und 3) 4 M NMM in DMF wurde jeweils kurz vor der Reaktion die jeweilige Reaktionsmischung mit folgenden Äquivalenten hergestellt: 6 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure, 6 Äq. HOBt, 5.4 Äq. HCTU und 12 Äq. NMM. Die Reaktionsmischung wurde auf das Harz gegeben und für 30 min zur Reaktion gebracht. Für die ersten 8 Kupplungen wurden Einfach-, darauf folgend Zweifach-Kupplungen durchgeführt.

Protokoll VII: Der Sulfonatlinker **5** wurde manuell an den N-Terminus gekuppelt. 4 Äq. Linker, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. DIPEA wurden in DMF für 45 min am Harz zur Reaktion gebracht. Die Linkerkupplung wurde doppelt durchgeführt.

Acetylierung:

Das Harz würde mit einer Mischung aus Acetanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89) für 5 min behandelt. Anschließend wurde es 3 Mal mit DMF gewaschen.

6.3.3) Manuelle PNA-Synthese

6.3.3.1) PNA-Synthese nach Fmoc-Strategie

Die manuelle Synthese von PNA-Oligomeren erfolgte an TGR-Harz mit Fmoc-geschütztem Amin und einer Beladung von ca. 0.2 mmol/g. Eine entsprechende Harzmenge wurde in einen Spritzenreaktor eingewogen und das Harz vor der Synthese für mindestens 30 min in DMF gequollen. Der erste Entschützungs-schritt wurde jeweils für *Fmoc-Monitoring* genutzt und der ermittelte Wert zur Berechnung der Ausbeute verwendet.

Entschützung:

Das Harz wurde zwei Mal für je 1.5 min mit einer Mischung aus DMF : Piperidin (4 : 1) behandelt. Es folgten Waschschr- itte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Kupplung:

Protokoll VIII: Es wurden 4 Äq. des entsprechenden Fmoc-geschützten PNA-Monomers, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in DMF gelöst. Das Volumen an DMF wurde in Abhängigkeit der Löslichkeit des Monomers so gering wie möglich gehalten, um eine hohe Konzentration der Reaktanden zu erhalten. Es wurden dennoch nie weniger als 100 µL Reaktionslösung verwendet. Diese Mischung wurde für 30 min mit dem Harz zur Reaktion gebracht. Ab dem 8. PNA-Monomer wurden Doppel-, ab dem 16. Monomer Dreifachkupplungen durchgeführt. Es folgten Waschschr- itte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Protokoll IX: Alkinmodifizierte PNA-Oligomere wurden generiert, indem N-terminal Propiolsäure oder 5-Hexinsäure gekuppelt wurde. Dabei wurden 4 Äq. Propiolsäure mit 4 Äq. Oxyma und 4 Äq. DIC aktiviert. 4 Äq. 5-Hexinsäure wurden mit 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM aktiviert, in DMF gelöst und die Kupplung für je 30 min durchgeführt. Das Harz wurde mit je mit je fünf Mal DMF und zehn Mal DCM gewaschen.

Acetylierung:

Das Harz würde mit einer Mischung aus Acetanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89) für 5 min behandelt. Anschließend wurde mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF gewaschen.

6.3.3.2) PNA-Synthese nach Boc-Strategie

Die Synthese von PNA-Oligomeren mit C-terminaler Thioesterfunktionalität wurde nach Boc-Strategie an Fmoc-Glycin-vorbeladenem MBHA-Harz mit einer Beladung von 0.3 mmol/g

6) Experimenteller Teil

durchgeführt. Die benötigte Harzmenge wurde in einen Spritzenreaktor eingewogen und das Harz vor der Synthese für mindestens 30 min in DMF gequollen. Durch den ersten Entschützungs-schritt wurde die Fmoc-Gruppe entfernt und für *Fmoc-Monitoring* genutzt. Der ermittelte Wert wurde zur Berechnung der Ausbeute verwendet. Der Thioester wurde generiert durch Kupplung des Trt-geschützten Thiols, Entfernen der Trityl-Schutzgruppe und Kupplung von Boc-Glycin. Von da an wurde nach Standard-Boc-Synthese-Protokoll verfahren.

Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe am Glycin-beladenen Harz:

Das Harz wurde zwei Mal für je 1.5 min mit je 500 µL einer Mischung aus DMF : Piperidin (4 : 1) behandelt. Die gesammelte Entschützungs-lösung wurde für *Fmoc-Monitoring* verwendet. Es folgten Waschschr- itte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Entfernen der Trt-Schutzgruppe:

Vor der Trt-Entschützung wurde das Harz zehn Mal mit DCM gewaschen. Die Entschützung wurde sauer mit einem Gemisch aus TFA : TIS (19 : 1) zwei Mal für je 15 min durchgeföhrt. Das Harz wurde zehn Mal mit DCM und anschließend fünf Mal mit DMF gewaschen.

Entfernen der Boc-Schutzgruppe:

Vor der Entschützung wurde das Harz jeweils zehn Mal mit DCM gewaschen. Die Boc-Schutzgruppe wurde entfernt, indem das Harz für 5 min mit einem Gemisch aus TFA : m-Kresol (95 : 5) behandelt wurde. Anschließend wurde zehn Mal mit DCM und fünf Mal mit DMF gewaschen.

Kupplung von S-Trt-Mercaptopropionsäure:

Es wurden 10 Äq. S-Trt-Mercaptopropionsäure, 10 Äq. PyBOP und 12 Äq. NMM in DMF gelöst, so, dass das Volumen möglichst gering gehalten wurde, jedoch 100 µL nicht unterschritt und das Harz vollständig bedeckt war. Die Mischung wurde mit dem Harz für 30 min zur Reaktion gebracht. Es wurde mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF gewaschen.

Kupplung:

Protokoll X: Es wurden 4 Äq. des entsprechenden Boc-geschützten PNA-Monomers, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in DMF gelöst. Das Volumen an DMF wurde in Abhängigkeit der Löslichkeit des Monomers so gering wie möglich gehalten, um eine hohe Konzentration der Reaktanden zu erhalten. Es wurden dennoch nie weniger als 100 µL Reaktionslösung verwendet. Diese Mischung wurde für 30 min mit dem Harz zur Reaktion gebracht. Ab dem 8. PNA-Monomer wurden Doppelkupplungen durchgeföhrt. Es folgten Waschschr- itte mit je fünf Mal DMF, fünf Mal DCM und fünf Mal DMF.

Acetylierung:

Das Harz wurde mit einer Mischung aus Acetanhydrid : 2,6-Lutidin : DMF (5 : 6 : 89) für 5 min behandelt. Anschließend wurde mit je fünf Mal DMF und zehn Mal mit DCM gewaschen.

6.3.4) Freisetzung der Peptide und PNA-Oligomere vom Harz

Nach vollendeter Synthese wurden die Peptide, Proteine und PNA-Oligomere vom Harz abgespalten und die Seitenkettenschutzgruppen entfernt. In allen Fällen wurde das Harz vor der Abspaltung entweder zehn Mal mit DCM gewaschen oder mit DCM gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung erfolgte unter Anwendung der jeweiligen Abspalllösung im Spritzenreaktor.

Freisetzung von TGR-Harz:

Peptide und PNA-Oligomere, die an TGR-Harz hergestellt wurden, wurden unter Verwendung von TFA : TIS : H₂O (96 : 2 : 2) abgespalten und entschützt. Das Harz wurde zunächst mit einem Volumen von 1 mL Abspalllösung für 2 – 3 h behandelt. Nachfolgend wurde zwei Mal für je 30 min mit je 1 mL TFA nachgespült und das Harz noch zwei Mal mit TFA gewaschen. Die vereinigten TFA-Eluate wurden mittels Druckluft auf ca. 100 µL je 1 µmol Ansatz eingengt. Das Produkt wurde in dem zehnfachen Volumen kalten Ethers (-80 °C) gefällt, für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und das Präzipitat unter Druckluft getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde über HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Freisetzung der Proteine EGF und TGFα vom TGR-Harz:

Die Proteine und deren Derivate wurden unter Verwendung von TFA : TIS : H₂O (96 : 2 : 2) abgespalten. Das proteinbeladene Harz wurde für je 10 – 30 min mit je 2 mL Abspalllösung behandelt, wobei neue Abspalllösung jeweils dann im Spritzenreaktor aufgezogen wurde, wenn sich erste Anzeichen von Präzipitation des Rohprodukts zeigten. Dies wurde für ca. 30 min durchgeführt. Ab da wurde mit reiner TFA bis zu einer Gesamtzeit von 3 h eluiert. Die gesammelten TFA-Lösungen mit einem Gesamtvolumen von ca. 12 mL wurden eingengt, das Produkt mit kaltem Ether gefällt und nach Zentrifugation bei 4 °C das Präzipitat erhalten. Für die Reinigung über Umkehrphasen-HPLC wurde das Produkt in TFA : H₂O (7 : 3) aufgenommen und in vier Injektionen auf der Säule angereichert, bevor der Gradient zur Trennung begonnen wurde. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Freisetzung von TGR-Harz in Anwesenheit von Dabcyl:

Peptide und PNA-Oligomere, die an TGR-Harz hergestellt wurden und den Löscher Dabcyl enthielten, wurden analog dem Standardprotokoll für die Freisetzung von TGR-Harz, allerdings unter Verwendung von TFA : m-Kresol : H₂O (96 : 2 : 2) abgespalten. Das Harz wurde mehrfach mit TFA nachgespült, die vereinigten Eluate eingengt, das Rohprodukt in kaltem Ether gefällt und über HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

6) Experimenteller Teil

Freisetzung von TGR-Harz in Anwesenheit von Phosphotyrosin:

Peptide, die den Baustein Fmoc-pTyr(NMe₂)₂-OH enthielten, wurden zunächst wie reguläre Peptide vom Harz freigesetzt. Nach Einengen der vereinigten Eluate wurde ein Volumen von ca. 10% Wasser hinzugegeben und das Gemisch über Nacht geschüttelt. Wenn in der Analyse über UPLCTM-MS die volle Abspaltung der Phosphat-Schutzgruppen gezeigt werden konnte, wurde TFA unter Druckluft weiter abgedampft, das Rohprodukt mit Wasser verdünnt und über HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Freisetzung von Sieber-Amid-Harz:

Zur Abspaltung wurde das peptidbeladene Harz in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Es wurde mit der Abspalllösung DCM : TFA : TIS (96 : 2 : 2) versetzt und für 2 min zur Reaktion gebracht. Es wurde 1 mL ACN : H₂O (1 : 1) hinzugegeben, geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Harz noch zwei weitere Male analog mit 1 mL ACN-Wasser-Gemisch gewaschen. Das Lösungsmittelgemisch wurde mit Wasser versetzt und anschließend über Lyophilisation entfernt. Das Rohprodukt wurde über HPLC aufgereinigt und die Produktfraktionen vereinigt und gefriergetrocknet.

Freisetzung von MBHA-Harz:

PNA-Oligomere, die als C-terminale Thioester an MBHA-Harz hergestellt wurden, wurden unter Verwendung von 1 mL TFA : TFMSA : m-Kresol (16 : 3 : 1) abgespalten und entschützt. Das Harz wurde für 2 h mit der Abspalllösung zur Reaktion gebracht und anschließend 2 x für je 30 min mit TFA gewaschen. Die vereinigten Eluate wurden mittels Druckluft eingeeengt, in kalten Ether gefällt, getrocknet und das entstandene Präzipitat über HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

6.3.5) Fmoc-Monitoring

Die Bestimmung der Beladung des Harzes bzw. der quantitativen Bewertung einer Kupplung erfolgte durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe in 1 mL DMF : Piperidin (4 : 1) und Messung der Absorption des Fluorenylpiperidin-Addukts in der Lösung bei 301 nm mit dem Extinktionskoeffizienten von 8300 L/(mol·cm). Hierfür wurde das *SmartSpec Plus* von *Biorad* mit einer Halbmikro-Quarzküvette 114-QS von *Hellma* verwendet. Die Konzentration an Fluorenylpiperidin-Addukt kann nach dem Lambert-Beer-Gesetz (Gln. 4) ermittelt und daraus die Stoffmenge freigesetzter Aminogruppen am Harz hergeleitet werden.

Lambert-Beer-Gesetz:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gln. 4

6.3.6) Herstellung funktionaler PNA-Peptid-Konjugate (CuAAC / SPAAC)

Herstellung über CuAAC:

Die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition wurde an der festen Phase durchgeführt. Das Harz mit dem azidtragenden Peptid wurde vor der Reaktion für mindestens 30 min in DMF gequollen. In entgastem DMF wurde unter Argon eine gesättigte Lösung aus Kupfer(I)iodid hergestellt und mit 1 Äq. Alkin-PNA und 4 Äq. DIPEA versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde in den zuvor mit Argon gespülten Spritzenreaktor gegeben und über Nacht zur geschüttelt. Eine umfangreiche Waschreihe mit 5x DMF, 5x DCM, 2x DMF, 10x gesättigte 8-Hydroxychinolinol-lösung, 2x 5 min 8-Hydroxychinolinollösung, 10x H₂O : DMF (1 : 1), 5x DMF, 2x 5 min DMF sollte neben der Abtrennung der Edukte vor allem eine vollständige Entfernung der Kupferionen gewährleisten. Das Produkt wurde vom Harz abgespalten und über HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Herstellung über SPAAC:

Die Thioester- oder Sulfonyl-Peptide wurden wie beschrieben an der festen Phase hergestellt, vom Harz abgespalten und über HPLC aufgereinigt. Die PNA-Oligomere wurden nach Fmoc-Strategie am Harz aufgebaut, abgespalten und ohne weitere Aufreinigung mit ALO (2-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)essigsäure) umgesetzt. Zur Kupplung von ALO **13** wurde entweder der freie N-Terminus verwendet oder der N-Terminus acetyliert und das ϵ -Amin eines C-terminalen Lysins genutzt. Es wurden je 20 μ mol ALO mit 22 μ mol DIC in 20 μ L DMF für 10 min im Schüttler aktiviert. Anschließend wurde 1 μ mol PNA in 20 - 100 μ L DMF hinzugegeben und für 1 h unter Schütteln zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde mit ACN : H₂O (1 : 1 mit 0.1% TFA) verdünnt und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Für die spannungsgeförderte Alkin-Azid-Cycloaddition wurden ALO-PNA und azidtragendes Peptid in 1:1-Stöchiometrie über Nacht zur Reaktion gebracht. Für Sulfonat-Konjugate wurde ACN : H₂O (1 : 1), für Thioester-Konjugate ACN : H₂O (3 : 1 mit 1% TFA) verwendet. Es wurde in ca. 0.5 – 1 mM Konzentration gearbeitet.

6.3.7) Native chemische Ligation zur PNA-Protein-Konjugation

Der Puffer (200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) wurde vor der Ligation für 30 min unter vermindertem Druck entgast und mit 20 mM Thiophenol und 20 mM TCEP versetzt. Zu dem vorgelegten Puffer wurden Cysteinylpeptid und PNA-Thioester hinzugegeben. Um die Löslichkeit der PNA zu erhöhen, wurde ACN (Endanteil ca. 20%) hinzugegeben bis die Reaktanden in einer Konzentration von 100 μ M vorlagen. Die Reaktion wurde über die Zeit mittels UPLCTM-MS verfolgt, indem

jeweils ein Aliquot entnommen, mit 2% TFA versetzt und analysiert wurde. Nach Beendigung der Reaktion nach ca. 2 h wurde das Lösungsmittel über Lyophilisation entfernt und das Rohprodukt über HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

6.3.8) Quantifikation von Peptiden sowie PNA- und DNA-Oligonukleotiden

Peptide bei $\lambda = 214$ nm:

Peptide und Peptidderivate, die keine aromatischen Komponenten enthielten wurden am SmartSpec Plus von *Biorad* mit einer Halbmikro-Quarzküvette 114-QS von *Hellma* quantifiziert. Die Absorption eines definierten Volumens des Puffers wurde zunächst als Hintergrundmessung bei 214 nm bestimmt. Nach Zugabe eines bestimmten Volumens der Probenlösung wurde erneut gemessen und die erhaltene Absorption über das Labert-Beer-Gesetz (Kapitel 6.3.9. Gln. 5) zur Errechnung der Probenkonzentration genutzt. Es wurde mit Absorptionen im Bereich von 0.1 – 0.8 gearbeitet. Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Peptids ergab sich additiv aus den einzelnen Koeffizienten der Aminosäuren sowie der Anzahl der Amidbindungen nach Kuipers *et al.*^[344] Selbst ermittelte Extinktionskoeffizienten sind in Kapitel 6.3.9. beschrieben.

Peptide sowie PNA- und DNA-Oligomere bei $\lambda = 260$ nm:

Peptide mit aromatischen Komponenten wurden am NanoDrop ND-1000 von *peqlab* quantifiziert. Es wurde mit Absorptionen im linearen Bereich von 0.1 – 0.8 gearbeitet. Die Extinktionskoeffizienten der Peptide ergaben sich additiv aus den Extinktionskoeffizienten aromatischer Aminosäuren und weiterer absorbierender Komponenten wie etwa Fluorophoren (siehe Tabelle II in Kapitel 6.3.9). Jene für PNA-Oligomere wurden aus literaturbekannten einzelnen Koeffizienten für die jeweiligen Monomere additiv ermittelt (siehe Tabelle II in Kapitel 6.3.9). Zur Quantifikation von DNA-Oligonukleotiden wurde der Extinktionskoeffizient über den OligoAnalyzer 3.1 von *IDT - Integrated DNA Technology* ermittelt. Zusätzliche Komponenten wie etwa Farbstoffe wurden additiv dazu gerechnet.

6.3.9) Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung von Extinktionskoeffizienten wurde eine Lösung der entsprechenden Verbindung in verschiedenen Konzentrationen bei der gewünschten Wellenlänge am UV/vis-Spektrometer SmartSpec Plus von *Biorad* oder NanoDrop 1000 von *peqlab* gemessen. Dabei wurde mit Absorptionen im Bereich von 0.1 – 0.8 gearbeitet. Die jeweilige Absorption wurde mindestens als Doppelmessung aufgenommen und im Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen. Nach Gln. 5, welche sich aus dem Lambert-Beer-Gesetz ergibt, wurde über lineare

6) Experimenteller Teil

Regression mit Hilfe des Programms Excel der Extinktionskoeffizient ermittelt. Der Anstieg entspricht dabei dem Produkt aus Extinktionskoeffizient und Schichtdicke d.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = (\varepsilon \cdot d) \cdot c \quad \text{Gln. 5}$$

$$y = m \cdot x \quad \text{Gln. 6}$$

In Tabelle II sind die so ermittelten Extinktionskoeffizienten (*) neben den literaturbekannten Werten für die PNA-Monomere und Fluorophore zusammengefasst. Sie wurden zu den Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Peptide sowie PNA- und DNA-Oligomere addiert, um die entsprechenden Verbindungen zu quantifizieren.

Tabelle II

| Verbindung | λ | ε [L/(mol·cm)] |
|-------------------------|-----------------------------|--|
| Azidohexansäure | 214 nm | 376* |
| Linker 5 | 214 nm | 8840* |
| Tryptophan | 260 nm | 3,673 |
| Tyrosin /Phosphotyrosin | 260 nm | 484 |
| MPAA | 214 nm | 4,883* |
| MPAA | 260 nm | 2,193* |
| FAM | 260 nm | 20,960 |
| TMR | 260 nm | 32,000 |
| Dabcyl | 260 nm | 8,683* |
| Cy3 | 260 nm | 4,930 |
| Cy5 | 260 nm | 10,000 |
| a-Monomer | 260 nm | 13,600 |
| c-Monomer | 260 nm | 6,600 |
| g-Monomer | 260 nm | 11,700 |
| t-Monomer | 260 nm | 8,600 |

6.3.10) Denaturierungsexperimente

Schmelzkurven von PNA- / DNA-Oligomeren:

Denaturierungsexperimente mit PNA- und/oder DNA-Oligomeren wurden am Carey 100 Bio von *Varian* in entgastem DNA-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) durchgeführt. Der Puffer wurde in einer Quarzglasküvette vorgelegt und die entsprechenden Oligonukleotide auf je 1 µM Endkonzentration hinzugegeben in einem Gesamtvolumen von 1 mL. Die Küvette wurde mit einem Deckel verschlossen und zunächst mit einer Geschwindigkeit von 10 °C/min auf 90 °C erhitzt. Nach 5 min wurde mit einer Geschwindigkeit von 10 °C/min auf 22 °C heruntergekühlt und diese Temperatur wiederum für 5 min gehalten. Die Messung selbst bestand aus drei Zyklen, in denen mit einer Geschwindigkeit von 0.5 °C/min auf 90 °C geheizt, 5 min die Temperatur gehalten, mit einer Geschwindigkeit von 10 °C/min auf 22 °C gekühlt und wieder für 5 min die Temperatur gehalten wurde. Während des langsamen Erwärmens der Probe wurde die Absorption bei 260 nm verfolgt und mit einem Ausleseintervall von 1 s aufgezeichnet. Die Schmelzkurven aus der gegen die Temperatur aufgetragene Absorption wurden jeweils zur Auswertung in GraphPad Prism 5 genutzt. Hierbei wurde die erste Ableitung jeder einzelnen Schmelzkurve durch Ableitung der einzelnen Punkte unter Betrachtung der nächsten 40 Nachbarn und Glättung vierten Grades gebildet. Das Maximum dieser Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Schmelzkurve und so der Schmelztemperatur des gegebenen Doppelstrangs.

Schmelzkurven von Coiled-Coil-Peptiden:

Analog wurden Denaturierungsexperimente an fluoreszent- bzw. Löscher-markierten Coiled-Coil-Peptidpaaren am Carey Eclipse von *Varian* vorgenommen. Die im jeweiligen Experiment angegebenen Puffer wurden zuvor entgast und in einer Quarzglasküvette vorgelegt. Die Peptide wurden in je 0.5 µM Konzentration bei einem Gesamtvolumen von 1 mL für Messung verwendet. Die Probe wurde zunächst hochgeheizt bei einer Rate von 10 °C/min bis 90 °C, für 5 min gehalten und runtergeheizt mit 10 °C/min auf 20 °C. Die Heiz- und Kühlzyklen für die Dreifachmessung wurden mit Geschwindigkeiten von 0.5 °C/min durchgeführt und an den Endpunkten bei 90 °C und 20 °C die Temperatur für 5 min gehalten. Die Auswertung der Schmelzkurven wurde wie im vorhergehenden Absatz beschrieben vorgenommen.

6.3.11) Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopie am AxioObserver A.1

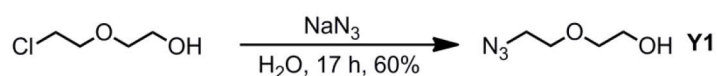
Erste Mikroskopieexperimente wurden am Axio Observer A.1 von Zeiss mit 20-fach vergrößerndem Objektiv durchgeführt. Dabei wurden optimale Resultate wurden erzielt, wenn 24-well-Kulturplatten mit einer 0.01%-igen Poly-D-Lysin-Lösung vorbehandelt wurden. Hierfür wurde die Lösung für 10 min in die Kavitäten gegeben, abgenommen und die Kavitäten für 30 min an der Luft getrocknet wurde. Je 100,000 HEK293-Zellen wurden pro Kavität gesät und am Folgetag die Transfektion mit 250 ng DNA und 2.5 µL Lipofektamine®2000 in Opti-MEM® für 1 h bei 37 °C durchgeführt wurde. Die Zellen wurden über Nacht in DMEM mit 10% FBS gehalten. Im Verlauf von 24 – 72 h nach der Transfektion konnte ein zufriedenstellender Anteil transfizierter, gesunder Zellen beobachtet werden. Zunächst wurden die Zellen im Durchlicht betrachtet, um ihre korrekte Form, ausreichende Konfluenz und Organisation als Anzeichen normalen Zellwachstums sicherzustellen. Anschließend wurde im Auflichtmodus im GFP-Kanal die Transfektion sichergestellt bzw. in TMR-Kanal die ersten Markierungsexperimente durchgeführt.

Mikroskopie am am Inversmikroskop IX83

Höher aufgelöste Bilder wurden am Mikroskop IX83 von Olympus bei 60-facher Vergrößerung gemessen. Als Träger wurden 8-well µ-slides mit der Beschichtung ibiTreat® von ibidi verwendet. Sie wurden mit 0.01%-iger Poly-D-Lysin-Lösung wie zuvor beschrieben vorbehandelt, je 10,000 HEK293-Zellen ausgesät und diese über Nacht in DMEM mit 10% FBS gehalten. Am Folgetag wurde die Transfektion mit 100 ng DNA und 1 µL Lipofektamine®2000 in 200 µL Opti-MEM® für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in DMEM mit 10% FBS gehalten und nach mindestens 20 h mikroskopiert.

Nach dem entsprechenden Experiment erfolgte die Mikroskopie in PBS-Puffer bei Raumtemperatur. Zunächst wurden transfizierten Zellen identifiziert und wie bereits beschrieben schichtweise mikroskopiert (Schichten entlang der Z-Achse in einem Abstand von 0.27 µm; Belichtungszeiten siehe Abschnitt 6.2). Die Rohdaten wurden durch Wiener-Dekonvolutionsmethode hintergrundkorrigiert. Die Ausleseparameter (Intensitätsprofil, Helligkeit und Kontrast) wurden so eingestellt, dass die fluoreszenten Bestandteile optimal sichtbar wurden. Kontrollmessungen und zu vergleichende Bilder wurden unter denselben Einstellungen exportiert.

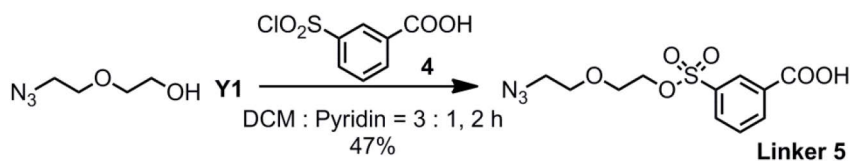
6.3.12) Synthesevorschriften

Sulfonatlinker (5)

Azidoethoxyethanol Y1: Die Herstellung der Verbindung ist literaturbekannt^[345], wurde jedoch in dieser Arbeit wie folgt modifiziert: Natriumazid (2.62 g, 40 mmol, 2 Äq.) wurde in einem Rundkolben in 25 mL Wasser gelöst. Es wurden Chloroethoxyethanol (2.12 mL, 2.50 g, 1 Äq.) und nochmals 25 mL Wasser hinzugegeben und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach 17 h wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt und extrahiert (4 x DCM). Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Produkt wurde als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten (1.58 g, 60%). Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit Literaturangaben.

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.69 (2 H, m, CH₂OH), 3.63 (2 H, m, OCH₂CH₂OH), 3.55 (2 H, m, OCH₂CH₂N₃), 3.35 (2 H, m, CH₂N₃), 2.35 (1 H, br, OH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 72.45 (CH₂-CH₂OH), 70.03 (CH₂-CH₂N₃), 61.73 (CH₂OH), 50.71 (CH₂N₃).



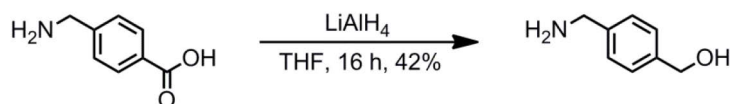
3-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)sulfonylbenzoessäure 5: Azidoethoxyethanol (30 µL, 29.7 mg, 0.227 mmol, 1 Äq.) wurde in einem Rundkolben in 1.36 mL Pyridin gelöst. 3-Chlorosulfonylbenzoessäure (100.0 mg, 0.453 mmol, 2 Äq.) wurde in 4 mL trockenem DCM gelöst und unter Kühlung im Eisbad hinzugegeben. Nach 2 h rühren wurde 5 M HCl tropfenweise hinzugegeben, bis sich der entstandene Niederschlag löst. DCM wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rest weiter mit Wasser verdünnt und mit Chloroform extrahiert (20 x 10 mL). Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in ACN : H₂O (1 : 1 mit 0.1 % TFA) aufgenommen und an der präparativen HPLC aufgereinigt (Gradient 30 – 90% Laufmittel B, Retentionszeit: 10 min). Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (33.6 mg, 47%). R_f = 0.76 (Toluol : Ethylacetat = 1 : 3 / 0.1% TFA)

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.66 (1 H, t, J = 1.60, O₃S-C-CH-C-COOH), 8.39 (1 H, dd, J = 1.30, 7.86, HOOC-C-CH-CH), 8.17 (1 H, ddd, J = 1.25, 1.73, 7.82, O₃S-C-CH-CH), 7.71 (1 H, t, J = 7.82, CH-CH-CH), 4.27 (2 H, m, O-CH₂-CH₂-O-SO₂), 3.73 (2 H, m, O-CH₂-CH₂-O-SO₂), 3.61 (2 H, m, N₃-CH₂-CH₂-O), 3.32 (2 H, t, J = 4.84, N₃-CH₂-CH₂-O).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.37 (COOH), 136.91 (C-SO₃), 135.13 (CH-CH-CCOOH), 132.59 (CH-CH-CSO₃), 130.90 (C-COOH), 129.72 (CH-CH-CH), 129.63 (O₃S-C-CH-C-COOH), 70.20 (N₃-CH₂-CH₂-O), 69.74 (O-CH₂-CH₂-O₃S), 68.59 (O-CH₂-CH₂-O₃S), 50.54 (N₃-CH₂-CH₂).

6) Experimenteller Teil

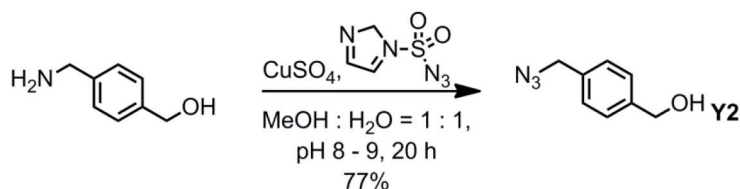
Sulfonatlinker (6)



p-Aminomethylbenzylalkohol: In einem ausgeheizten Kolben wurde *p*-Aminomethylbenzoesäure (3.00 g, 19.8 mmol, 1 Äq.) eingewogen und unter Argon in 100 mL trockenem THF gelöst. In einem weiteren ausgeheizten Kolben wurde Lithiumaluminiumhydrid (3.5 M in THF, 12 mL, 40 mmol, 2 Äq.) vorgelegt, durch ein Eisbad gekühlt und langsam die THF-Lösung hinzugegeben. Der Kolben der Einwaage wurde mit trockenem Diethylether nachgespült. Nach einer Stunde wurde ein weiteres Äquivalent Lithiumaluminiumhydrid-Lösung hinzugegeben und 2 h bei 65 ° C gerührt. Danach wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser und 0.1 M NaOH-Lösung beendet, um überschüssiges Reduktionsmittel abzufangen. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit Ethylacetat gewaschen und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde extrahiert (2x Ethylacetat), die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten (1.13 g, 42%). $R_f = 0.16$ (DCM : MeOH = 4 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.33 (4 H, s, H_{arom}), 4.59 (2 H, s, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.83 (2 H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 141.91 ($\text{C-CH}_2\text{-OH}$), 141.03 ($\text{C-CH}_2\text{-NH}_2$), 128.78 (2 C, $\text{CH-C-CH}_2\text{-OH}$), 128.35 ($\text{CH-C-CH}_2\text{-NH}_2$), 64.97 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 46.06 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

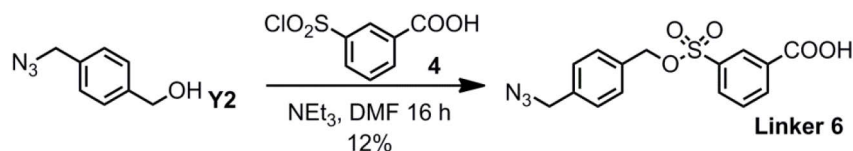


p-Azidomethylbenzylalkohol Y2: *p*-Aminomethylbenzoesäure (100.0 mg, 0.729 mmol, 1 Äq.), Imidazolsulfonylazid (182.0 mg, 0.869 mmol, 1.2 Äq.) und eine katalytische Menge Kupfersulfat (1.8 mg, 12 μmol , 0.02 Äq.) wurden in einem Rundkolben vorgelegt und in 4 mL MeOH : H_2O (1 : 1) gelöst. Mit einigen Spatelspitzen Natriumcarbonat wurde der pH-Wert der Lösung auf 8 – 9 eingestellt und die Lösung über Nacht gerührt, wobei der pH-Wert wiederholt nachjustiert wurde. Nach 20 h wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt, die verbleibende wässrige Phase in 40 mL DCM : H_2O (1 : 1) aufgenommen, getrennt und die wässrige Phase weiter mit DCM extrahiert (3 x 20 mL). Die organische Phase wurde mit Wasser, 1 M HCl und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch in Cyclohexan : Ethylacetat (1 : 1). Das Produkt wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten (91.2 mg, 77%). $R_f = 0.68$ (DCM : MeOH = 9 : 1).

6) Experimenteller Teil

^1H -NMR (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.36-7.32 (4 H, m, CH_{arom}), 4.68 (2 H, s, CH_2OH), 4.32 (2 H, s, CH_2N_3), 2.10 (1 H, br, OH).

^{13}C -APT-NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 140.97 (C_{arom} , $\text{R}_2\text{C}-\text{CH}_2\text{N}_3$), 134.57 (C_{arom} , $\text{R}_2\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$), 128.39 (2 C_{arom} , $\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{N}_3$), 127.30 (2 C_{arom} , $\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$), 64.76 (CH_2OH), 54.45 (CH_2N_3).

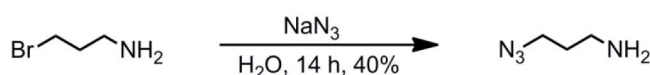


3-(((4-Azidomethyl)benzyl)oxy)sulfonyl)benzoesäure 6: Der Azidoalkohol (34 mg, 0.21 mmol, 1 Äq.) und das Sulfonylchlorid (46 mg, 0.21 mmol, 1 Äq.) wurden in 3.3 mL trockenem DMF gelöst und 1.1 mL Triethylamin (803 mg, 7.94 mmol) hinzugegeben. Es wurde über Nacht gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt nach erneutem Lösen in DCM auf Kieselgel aufgezogen. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (Toluol : Ethylacetat (0.1 % TFA) = 9 : 1 \rightarrow 4 : 1) und ergab einen gelblichen Feststoff (8.8 mg, 12 %). Das Produkt konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden, wurde jedoch um Verluste zu vermeiden keiner weiterführenden Reinheitsanalyse unterzogen.

gesucht: 347.35 g/mol;

gefunden: 347.1 g/mol.

Sulfonatlinker (7)

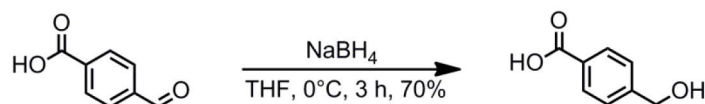


1-Amino-3-azidopropan: 3-Bromopropylamin (1.68 g, 7.69 mmol, 1 Äq.) wurde in einen Kolben eingewogen und in 5 mL Wasser gelöst. Natriumazid (1.00 g, 15.38 mmol, 2 Äq.) wurde ebenfalls in 5 mL Wasser gelöst und unter Rühren hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht refluxiert. Nach 14 h wurden einige Spatelspitzen Kaliumhydroxid hinzugegeben um eine Azidifizierung zu verhindern. Die abgekühlte Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt, mit 30 mL nachgespült und mit Diethylether (4 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten (0.30 g, 40%). Analysedaten sind in Übereinstimmung mit Literaturdaten.^[346]

^1H -NMR (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 4.84 (2 H, br, NH_2), 3.37 (2 H, t, CH_2N_3), 2.71 (2 H, t, CH_2NH_2), 1.73 (2 H, m, CH_2).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 50.30 (CH_2N_3), 39.97(CH_2NH_2), 32.98(CH_2).

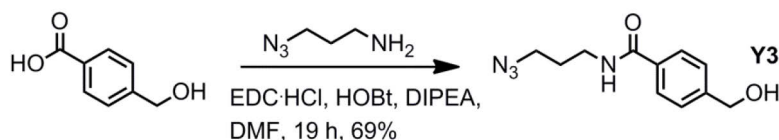
6) Experimenteller Teil



p-Hydroxymethylbenzoesäure: *p*-Carboxybenzaldehyd (1.59 g, 10.58 mmol, 1 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Schlenkkolben in 13 mL trockenem THF gelöst. Natriumborhydrid (0.80 g, 21.15 mmol, 2 Äq.) wurden in einem weiteren ausgeheizten Kolben vorgelegt und mit 5 mL trockenem THF zu einer Suspension verrührt. Unter Kühlung über ein Eisbad wurde die Natriumborhydridsuspension zum *p*-Carboxybenzaldehyd hinzugegeben und für 3 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und das THF am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde mit 5 M HCl gefällt und mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst, auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan → Ethylacetat / 0.1 % TFA). Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (1.15 g, 70%). $R_f = 0.38$ (Cyclohexan : Ethylacetat = 1 : 1 / 1% TFA).

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 12.86 (1 H, s, COOH), 7.91-7.90 (2 H, d, CH-C-COOH), 7.44-7.42 (2 H, d, CH-C-CH₂), 5.36 (1 H, s, OH), 4.57 (2 H, s, CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 167.24 (COOH), 147.73 (C-COOH), 129.14 (2 C_{arom}, CH-C-COOH), 129.03 (C-CH₂OH), 126.11 (2 C_{arom}, CH-C-CH₂OH), 62.38 (CH₂OH).

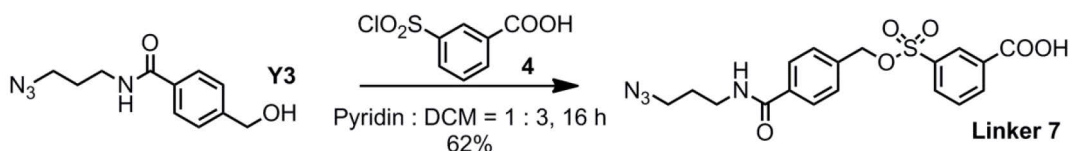


N-Azidopropyl-*p*-hydroxymethylbenzamid Y3: *p*-Hydroxymethylbenzoesäure (45.6 mg, 0.30 mmol, 1 Äq.), EDC (63.3 mg, 0.33 mmol, 1.1 Äq.) und HOBt (81.1 mg, 0.60 mmol, 2 Äq.) wurden in einen Rundkolben eingewogen und in 200 μL DMF gelöst. 1-Amino-3-azidopropan (60.1 mg, 0.60 mmol, 2 Äq.) wurde in 100 μL DMF gelöst. Es wurde zum Gemisch im Rundkolben DIPEA (129.6 μL , 97.0 mg, 0.75 mmol, 2.5 Äq.) hinzugegeben und das gelöste Azidoamin hinzugegeben und über Nacht gerührt. Nach 19 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer mit Hilfe von Toluol entfernt und der bräunliche Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Toluol : Ethylacetat 1 : 1 / 0.5% Ameisensäure → 1 : 4 / 0.5% Ameisensäure). Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (49.0 mg, 69%). $R_f = 0.18$ (Cylcohexan : Ethylacetat = 1 : 2)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.72-7.70 (2 H, m, CH-C-CO), 7.41-7.38 (2 H, m, CH-C-CH₂OH), 6.48 (1 H, br, NH), 4.75 (2 H, s, CH₂OH), 4.57 (1 H, br, OH), 3.55 (2 H, dt, CH₂-NH), 3.45 (2 H, t, CH₂N₃), 1.91 (2 H, tt, CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm]=: 167.71 (CONH), 144.62 (C-CH₂OH), 133.33 (C-CONH), 127.05 (2 C_{arom}, CH-C-CH₂OH), 126.81 (2 C_{arom}, CH-C-CONH), 64.59 (CH₂OH), 49.61 (CH₂N₃), 37.91 (CH₂-NH), 28.69 (CH₂).

6) Experimenteller Teil

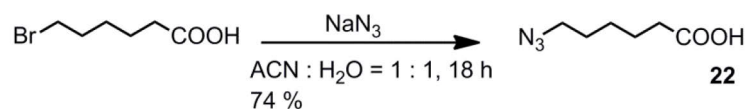


3-(((4-((Azidopropyl)carbamoyl)benzyl)oxy)sulfonyl)benzoesäure 7: *N*-(3-Azidopropyl)-4-(hydroxymethyl)benzamid (8.5 mg, 36 μmol , 1 Äq.) wurde in Pyridin (6 μL , 5.7 mg, 72 μmol , 2 Äq.) aufgenommen. 3-Chlorosulfonylbenzoesäure (15.9 mg, 72 μmol , 2 Äq.) wurde in 1 mL trockenem DCM gelöst, zum Azidoalkohol hinzugegeben und für 2.5 h gerührt. Das Lösungsmittel und die Base wurden unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol : Ethylacetat = 9 : 1 \rightarrow 3 : 7). Das Produkt wurde als braunes Öl in 62% Ausbeute (15 mg) erhalten und massenspektrometrisch im Negativmodus über ESI-MS untersucht:

gesucht: 418.42 g/mol;

gefunden: 417.30 g/mol.

Azidohexansäure (22):



6-Azidoheptanoic acid 22: Bromhexansäure (1.51 g, 7.7 mmol, 1 Äq.) und Natriumazid (1.18 g, 7.7 mmol, 1 Äq.) wurden in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (1 : 1) 0.25 M gelöst und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Acetonitril wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der pH-Wert der wässrigen Phase auf pH 6 gebracht. Es wurde viermal mit Diethylether extrahiert, die organische Phase getrocknet und unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten (901 mg, 74%).

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 3.28 (2H, t, CH_2COOH), 2.38 (2H, t, CH_2N_3), 1.70 (2H, dt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.59 (2H, dt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 1.44 (2H, dt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (175MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 179.51 (COOH), 51.18 (CH_2COOH), 33.75(CH_2N_3), 28.52 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 26.14 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 24.13 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

6.4) Experimente zur Zeitabhängigkeit von Reaktionen

6.4.1) Sulfonat- und Thioester-vermittelter Transfer (UPLC™)

Die zeitabhängigen Untersuchungen der Transferreaktionen mit PNA-Peptid-Konjugaten wurden in Schnappdeckelreaktionsgefäßen durchgeführt und zu bestimmten Zeitpunkten Aliquote der Lösung mittels UPLC™ analysiert. Der verwendete Transferpuffer (100 mM Na₂HPO₄) wurde vorab für 30 min entgast. Experimente zum Transfer mit Thioester-Konjugaten verliefen bei pH 7.0, während der Transfer durch Sulfonat-basierte Konjugate bei pH 8.0 durchgeführt wurde. Das Reduktionsmittel TCEP wurde aus einer 100 mM TCEP-Stammlösung hinzugegeben, um eine Konzentration von 1 mM TCEP zu erreichen. Das Cysteinylpeptid mit 5 µM Endkonzentration für den Sulfonat- und 2.5 µM Konzentration für den Thioestertransfer wurde hinzugegeben und für 10 min inkubiert. Mit Zugabe eines Äquivalents des PNA-K3-Konjugats wurde die Reaktion gestartet. Zur Untersuchung des Reaktionsverlaufs wurde zum jeweiligen Zeitpunkt ein Aliquot von 20 µL entnommen, mit Zugabe von 0.4 µL TFA die Reaktion beendet und 10 µL in die UPLC™ injiziert. Die verwendeten Gradienten sind in den jeweiligen Experimenten angegeben. Eine Auswertung erfolgte über die Peakflächen, welche mit den Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Verbindung ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Stöchiometrien der Edukte und Produkte wurden so ermittelt. Auf Grund der erhöhten Proximität der Reaktanden wurde die Annäherung des Reaktionsverlaufs über Gln. 7 vorgenommen, die eine Reaktion pseudo-erster Ordnung beschreibt.

$$Y = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot e^{(-k \cdot X)} + \text{Plateau} \quad \text{Gln. 7}$$

6.4.2) Fluoreszenz-detektierte Transferexperimente (HPLC-FL/DAD)

Der zeitliche Verlauf von Fluorophortransferreaktionen wurde an der HPLC mit Fluoreszenzdetektion verfolgt, wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen jeweils dem Farbstoff entsprechend gewählt wurden (siehe Kapitel 6.2). Der Transferpuffer (100 mM Na₂HPO₄ pH 7.0) wurde für 30 min unter vermindertem Druck entgast und in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Aus einer 100 mM Stammlösung wurde TCEP zu einer Konzentration von 1 mM und das Cysteinylpeptid zu einer Konzentration von 0.5 µM hinzugegeben. Nach 10 min wurde der Peptid-Thioester zugesetzt und so die Transferreaktion gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Aliquot von 50 µL in ein HPLC-Gefäß überführt und durch Zugabe von 1 µL TFA die Reaktion beendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Integration der Peakflächen. Die Integrale wurden mit den Extinktionskoeffizienten der zugeordneten Verbindungen ins Verhältnis gesetzt und daraus die Edukt- /Produktverhältnisse ermittelt.

6.4.3) Strangverdrängungsexperimente am Fluoreszenzspektrometer

PNA-DNA-Strangverdrängungsexperimente:

Der verwendete DNA-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.0) wurde vor der Messung für 30 min unter vermindertem Druck entgast. 985 µL des Puffers wurden in einer Quarzglas-küvette vorgelegt und 5 µL (0.5 nmol) des FAM-markierten Strangs sowie 5 µL des unmarkierten PNA-Strangs (0.5 nmol) bzw. 5 µL Puffer hinzugegeben. Die Küvette wurde mit einem Deckel versehen und die komplementären Oligomere wurden hybridisiert, indem auf 90 °C hochgeheizt und anschließend wieder auf 20 °C heruntergekühlt wurde. Die Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt, um den zellulären Bedingungen nahe zu kommen. Die Messung der Fluoreszenz bei den FAM-spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ wurde mit einer Frequenz von einem Datenpunkt je 12 s mit einer Anregungsdauer von 1 s gestartet. Nach 1 min wurde der Löscher-markierte Verdrängungsstrang (5 µL, 0.5 nmol) hinzugegeben und die Lösung gerührt. Die Messung wurde hierfür nicht unterbrochen. Das Absinken der Fluoreszenz wurde bis 9 min nach der letzten Zugabe aufgezeichnet und die Daten im Programm GraphPad Prism 5 dargestellt. Um Schwankungen der Startintensität auszugleichen, wurde normalisiert, indem die Startfluoreszenz auf 1 und die finale Fluoreszenzintensität auf 0 gesetzt wurde.

Peptid-Strangaustausch- und -Verdrängungsexperimente:

Protokoll I – Zugabe äquimolarer Mengen mit steigender Peptidlänge: Der verwendete Peptid-Puffer (100 mM Na₂HPO₄ pH 7.0) wurde vor der Messung für 30 min unter vermindertem Druck entgast. 995 µL des Puffers wurden in einer Quarzglasküvette vorgelegt und 5 µL (0.5 nmol) des FAM-markierten Peptids zu einer Startkonzentration von 0.5 µM vorgelegt. Die Fluoreszenz bei den FAM-spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ wurde mit einer Frequenz von einem Datenpunkt je 12 s mit einer Anregungsdauer von 1 s aufgezeichnet. Es wurde ca. 2 – 3 min gewartet, bis zur Signalstabilität. Die Messung wurde begonnen mit der aufgezeichneten Fluoreszenz des FAM-Peptids und zu den im Experiment angegebenen Zeitpunkten jeweils ein Äquivalent (5 µL, 0.5 nmol) des Löscher- bzw. Rekonstitutions-Peptid hinzugegeben. Die Zeitpunkte richteten sich dabei nach der Geschwindigkeit des erreichten Plateaus.

Protokoll II – Zugabe äquimolarer Mengen von Löscher- und Rekonstitutions-Peptid: Der verwendete Peptid-Puffer (100 mM Na₂HPO₄ pH 7.0) wurde vor der Messung für 30 min unter vermindertem Druck entgast und 995 µL in einer Quarzglasküvette vorgelegt. 5 µL (0.5 nmol) des FAM-markierten Peptids wurden in einer Startkonzentration von 0.5 µM vorgelegt, die Messparameter wie in Protokoll I gewählt und es wurde bis zur Signalstabilität gewartet. Drei

6) Experimenteller Teil

Minuten nach Messbeginn wurden 5 µL (0.5 nmol) des löschermarkierten Peptids hinzugegeben. In zeitlichen Abständen von je 3 min wurden dann abwechselnd das Rekonstitutions-Peptid (5 µL, 0.5 nmol) und das Löscher-Peptid (5 µL, 0.5 nmol) hinzugegeben.

Protokoll III – Zugabe steigender Konzentrationen von Löscher- und Rekonstitutions-Peptid: Der Peptid-Puffer (100 mM Na₂HPO₄ pH 7.0) wurde vor der Messung für 30 min unter vermindertem Druck entgast und 995 µL in einer Quarzglasküvette vorgelegt. 5 µL (0.5 nmol) des FAM-markierten Peptids wurden in einer Startkonzentration von 0.5 µM vorgelegt, die Messparameter wie in Protokoll I gewählt und es wurde bis zur Signalstabilität gewartet. Die Zugabe von Löscher- und Rekonstitutions-Peptid erfolgte mit steigenden Konzentrationen im zeitlichen Abstand von je 3 min gemäß folgender Tabelle:

Tabelle III

| Volumen | Stammlösung | Peptid | Stoffmenge | Äq. |
|---------|-------------|--------|------------|-----|
| 5 µL | 100 µM | Q-Kx | 0.5 nmol | 1 |
| 5 µL | 100 µM | Ac-Ex | 0.5 nmol | 1 |
| 4 µL | 250 µM | Q-Kx | 1 nmol | 2 |
| 4 µL | 250 µM | Ac-Ex | 1 nmol | 2 |
| 6 µL | 250 µM | Q-Kx | 1.5 nmol | 3 |
| 6 µL | 250 µM | Ac-Ex | 1.5 nmol | 3 |
| 4 µL | 500 µM | Q-Kx | 2 nmol | 4 |
| 4 µL | 500 µM | Ac-Ex | 2 nmol | 4 |
| 6 µL | 500 µM | Q-Kx | 3 nmol | 6 |
| 6 µL | 500 µM | Ac-Ex | 3 nmol | 6 |
| 8 µL | 500 µM | Q-Kx | 4 nmol | 8 |
| 8 µL | 500 µM | Ac-Ex | 4 nmol | 8 |
| 10 µL | 500 µM | Q-Kx | 5 nmol | 10 |
| 10 µL | 500 µM | Ac-Ex | 5 nmol | 10 |

6.4.4) Peptid-Strangverdrängungsexperimente über Fluoreszenzanisotropie

Die Studien zur Bindungsaffinität von mono- und bivalenten Peptidpaaren an das Protein Syk wurden am SPEX Fluoromax-3 Spektrofluorometer von Horiba durchgeführt. Der Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5) wurde vor jedem Experiment für mindestens 30 min unter vermindertem Druck entgast und mit 0.001% BSA aus einer 1%-igen wässrigen BSA-Stammlösung versetzt. Das bivalente FAM-Referenz-Peptid (FAM-K**p**YTGLNTRSQET**p**YETLG) wurde aus einer 1 µM Stammlösung in Puffer in einer Konzentration von 20 nM hinzugegeben. Diese Peptidlösung wurde in der Küvette vorgelegt und die jeweilige Messung bei den Wellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ und dem G-Faktor $G = 0.64$ durchgeführt. Vor der Zugabe von Protein wurde darauf geachtet, dass die Anisotropie konstant blieb.

Bindungsaffinität des Referenz-Peptids (K_D):

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität wurde das FAM-Referenz-Peptid wie beschrieben in der Küvette in entgastem Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA) vorgelegt und Syk aus einer 10 µM Stammlösung mit 20 nM FAM-Referenz-Peptid hinzutitriert. Jede Messung bestand aus mindestens zehn aufgenommenen einzelnen Messpunkten, von welchen jene bei Signalkonstanz in die Auswertung übernommen wurden. Mindestens fünf konstante Einzelpunkte wurden gewertet. Die Auswertung erfolgte im Programm GraphPad Prism 5, in welchem die gemessene Anisotropie gegen die volumenkorrigierte Konzentration an Syk aufgetragen wurde. Die Daten wurden über die Gleichung 8 angenähert und daraus der K_D -Wert ermittelt. Die Messung wurde dreifach vorgenommen.

$$A = A_f + (A_b - A_f) \cdot \frac{c_{FAM} + K_D + c_T - \sqrt{(c_{FAM} + K_D + c_T)^2 - 4c_{FAM}c_T}}{2c_{FAM}} \quad \text{Gln. 8}$$

A_f – Anisotropie des freien Referenz-Peptids

c_{FAM} – Konzentration des Referenz-Peptids

A_b – Anisotropie des gebundenen Referenz-Peptids

c_T – Konzentration des Titrators

K_D – Dissoziationskonstante

Verdrängungsexperimente (EC_{50}):

Die mittlere effektive Konzentration eines Peptids / Peptidpaares, die zur Verdrängung des FAM-markierten Referenz-Peptids (FAM-K**p**YTGLNTRSQET**p**YETLG) benötigt wird, wurde bestimmt, indem der jeweilige Kompetitor zum FAM-Peptid-gebundenen Syk in steigenden Konzentrationen hinzutitriert wurde. Hierfür wurde zu 249 µL der 20 nM FAM-Referenz-Peptid-Lösung (entspricht der minimalen Anisotropie, auf 0 normiert) in entgastem Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA) 1.25 µL Syk (40 µM Stammlösung mit 20 nM Referenz-Peptid) zu einer finalen Konzentration von 200 nM hinzugefügt (entspricht der maximalen

6) Experimenteller Teil

Anisotropie, auf 1 normiert). Aus den drei Stammlösungen i) 5 μM , ii) 50 μM und iii) 500 μM wurde der jeweilige Kompetitor mit je 20 nM Referenz-Peptid in steigenden Konzentrationen titriert. Jede Messung bestand aus mindestens zehn aufgenommenen einzelnen Messpunkten, von welchen jene bei Signalkonstanz in die Auswertung übernommen wurden. Mindestens fünf konstante Einzelpunkte wurden gewertet. Die Auswertung erfolgte im Programm GraphPad Prism 5, in welchem die gemessene Anisotropie gegen den dekadischen Logarithmus der volumenkorrigierten Konzentration an Kompetitor aufgetragen wurde. Die Anisotropie bei $\log(c[\text{nM}]) = 0$ entspricht dabei 20 nM Referenz-Peptid mit 200 nM Syk, während der auf $\log(c[\text{nM}]) = 8$ festgelegte Endpunkt die minimal mögliche Anisotropie von reinem FAM-Referenz-Peptid ist. Der Kurvenverlauf wurde über Gleichung 9 genähert und daraus der EC_{50} -Wert ermittelt. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt.

$$A = A_{\min} + \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + 10^{(\log(\text{EC}_{50}) - c_T) \cdot \text{HillSlope}}} \quad \text{Gln. 9}$$

A_{\min} – minimale Anisotropie

c_T – Konzentration des Titrators

A_{\max} – maximale Anisotropie

HillSlope – Steigung einer sigmoidalen Kurve

Experimente zur Schaltbarkeit bi→monovalent:

Um zu untersuchen, ob bivalente Coiled-Coil-basierte Syk-Bindungspartner durch Zugabe von Rekonstitutions-Peptid in den ungebundenen monovalenten Zustand gebracht werden können, wurden zu verschiedenen Konzentrationen 1 – 8 μM bivalenter Systeme Rekonstitutions-Peptid titriert und der Anstieg der Anisotropie beobachtet. Hierfür wurde in entgastem Puffer (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.001% BSA) zu 249 μL der 20 nM FAM-Referenz-Peptid-Lösung (auf 0 normiert) 1.25 μL Syk (40 μM Stammlösung mit 20 nM Referenz-Peptid, auf 1 normiert) zu einer finalen Konzentration von 200 nM hinzugefügt. Je Experiment wurden 1, 4, 6, 8 μM an bivalentem Peptidpaar **93** und **94** mit 20 nM FAM-Referenz-Peptid hinzugegeben und die Anisotropie als mindestens zehn Einzelpunkte, von welchen mindestens fünf gewertet wurden, bestimmt. Anschließend wurde aus 250 μM bzw. 500 μM Stammlösungen Rekonstitutions-Peptid **84** mit 20 nM FAM-Referenz-Peptid hinzutitriert. Die gemessene normalisierte Anisotropie wurde gegen die Konzentration an Rekonstitutions-Peptid **84** linear aufgetragen. Die Umrechnung in Anteil an frei-gesetztem Referenz-Peptid wurde nach Gleichung 10 durchgeführt.

Aus der normalisierten Anisotropie ergeben sich folgende Zusammenhänge:

$A_0 = A_{\text{frei}} \triangleq 0\%$ gebundenes Referenz-Peptid

$A_1 = A_{\text{gebunden}} \triangleq 100\%$ gebundenes Referenz-Peptid

$A_Y \triangleq Y\%$ gebundenes Referenz-Peptid und $A_Y = f(c[\mathbf{84}])$.

$$[\text{FAM}]_{\text{frei}} = 1 - A_{c[\text{RP}]} \quad \text{Gln.10}$$

$[\text{FAM}]_{\text{frei}}$ – Anteil an frei-gesetztem Referenz-Peptid
 $c[\text{RP}]$ – Konzentration an Rekonstitutions-Peptid

$A_{c[\text{RP}]}$ – Anisotropie bei $c[\text{RP}]$

6.5) Biochemische Methoden

6.5.1) Zelllysis

Zur Herstellung von Zelllysaten (zur Auftrennung über SDS-PAGE und anschließende Western Blot) wurde die Zellkulturplatte auf Eis gelegt, das Medium entfernt und Lysispuffer RIPA^{complete}STOP hinzugegeben. Für Experimente in 6-well-Platten mit 300,000 Zellen / well wurden 80 µL, in 24-well-Platten mit 100,000 Zellen / well 40 µL Puffer verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, in ein Schnappdeckelgefäß überführt und für 30 min auf Eis sanft geschüttelt. Anschließend wurden die Lysate bei 4 °C für 20 min bei 12,000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Lysate wurden bei -20 °C bis zur weiteren Anwendung gelagert.

6.5.2) Gelelektrophorese

Native Gele für die PNA-DNA-Interaktion:

Gele zum Nachweis der Hybridisierung von Oligonukleotiden wurden in der Gelelektrophoresekammer EasyPhor PAGE Mini von Biozym mit fluoreszent markierten Strängen durchgeführt. Die Gele wurden als 15%- (2 mL TB-Puffer, 3.75 mL RotiphoreseGel 40®, 4.15 mL H₂O, 100 µL 10%-ige wässrige APS-Lösung, 10 µL TEMED) bzw. 20%-ige (2 mL TB-Puffer, 5 mL RotiphoreseGel 40®, 2.6 mL H₂O, 100 µL 10%-ige wässrige APS-Lösung, 10 µL TEMED) Gele ohne Sammelgel gegossen. Die Proben mit einer Konzentration von 1 µM je Strang wurden durch Erhitzen auf 90 °C und langsames Abkühlen (max. 2 °C / min) auf 10 °C hybridisiert und auf Eis gelagert. 16 µL Probe wurden mit 4 µL Ladepuffer I (4% 5x-TB-Puffer, 50% Glycerol in H₂O) vermischt und 10 µL (8 pmol) Probe je Tasche aufgetragen. Die erste Tasche wurde jeweils mit einer Mischung mehrerer nicht-hybridisierender Stränge verschiedenen Molekulargewichts beladen, um als Leiter zu dienen. Das Laufpuffer I (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 150 mM NaCl) wurde bei 4 °C vorgekühlt in die Kammer gegeben und das Gel, wenn nicht anders angegeben, im Kühlschrank (4 °C) bei 160 V für ca. 3 h laufen gelassen. Ausgelesen wurde das Gel in einer Klarsichtfolie an der Image Station MM Pro von Kodak.

SDS-PAGE:

Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde zur Auftrennung und Analyse von Lysaten im späteren Western Blot verwendet. Die Lysate wurden auf ihren Proteingehalt im Bradford-Assay quantifiziert und jeweils ein Aliquot mit Wasser auf eine Konzentration von 6 µg/µL verdünnt. 15 µL einer solchen Lysatlösung wurden mit 15 µL Ladepuffer II (100 mM Tris, 4% SDS, 20% Glycerol, 200 mM DTT, 0.1% Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Lysate wurden abgekühlt, zentrifugiert und in

6) Experimenteller Teil

zwei Gelen parallel je 10 µL aufgetragen. Die jeweils erste Tasche wurde mit 6 µL Proteinleiter (10 – 180 kDa, vorgefärbt) beladen. Die Gele wurden als 8%-ige Trenngele mit 4%-igen Sammelgelen gegossen. Hierfür wurden zunächst je 4.5 mL Trenngel (3.75 mL 1M-Tris-Lösung, 100 µM 10%-ige SDS-Lösung, 2 mL RotiphoreseGel 40®, 4.05 mL H₂O, 100 µL 10%-ige wässrige APS-Lösung, 6 µL TEMED) zwischen die Platten gegeben und mit Isopropanol übergossen. Nachdem das Trenngel gehärtet war, wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel (1.25 mL TBS-Puffer, 100 µL 10%-ige SDS-Lösung, 1 mL RotiphoreseGel 40®, 7.6 mL H₂O, 100 µL 10%-ige wässrige APS-Lösung, 10 µL TEMED) hinzugegeben und mit Kamm ausgehärtet. Die beladenen Gele wurden in SDS-Puffer (3.02 g/L Tris, 15 g/L Glycin, 1 g/L SDS) für 30 min mit 80 V und für weiter 2.5 h mit 110 V gelaufen.

6.5.3) Bradford-Assay

Der Proteingehalt von Lysaten wurde über einen Bradford-Assay kolorimetrisch am POLARstar Optima von *BMG* bestimmt. Hierfür wurde bei jedem Experiment eine Kalibrierreihe aus einer BSA-Stammlösung mit der Konzentration von 0.1 mg/mL aufgenommen und die Absorptionen der Probelösungen mit dieser Geraden abgeglichen. Die Absorption bei $\lambda = 580$ nm ist jeweils abhängig von der Komplexierung des Coomassie-Farbstoffs im verwendeten Bradford-Reagenz durch Proteine. In einer durchsichtigen 96-well-Platte wurden je 160 µL Bradford-Reagenz (10% Phosphorsäure (85%-ig), 5% Ethanol, 0.01% Coomassie Brilliant Blue), 39 µL H₂O und 1 µL Lysat je *well* gegeben. Als Kalibrierreihe wurden zu 160 µL Bradford-Reagenz je 1 µL RIPA^{completeSTOP} und 0, 4, 8, 12 bzw. 20 µL BSA-Stammlösung hinzugegeben und auf 200 µL Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt (39, 35, 31, 27, 19 µL). Die gemessenen Absorptionen wurden mit einer linearen Funktion genähert und mittels dieser Funktion die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

6.5.4) Western Blot

Zur Analyse von Lysaten auf ihre Anteile an EGFR und pEGFR in Relation zu β -Tubulin als internem Standard wurde zunächst das jeweilige Lysat über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (0.45 µm Porengröße, Whatman®) übertragen. Hierfür wurde das Nass-Blotting-System Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell von *Biorad* verwendet. Jeweils zwei gleiche Gele wurden nach der Trennung gemeinsam mit zwei Stücken an Membran, den Filtern und den Pads für ca. 15 min WB-Puffer equilibriert. Die einzelnen Teile wurden in der Kassette nach Herstellerangaben übereinander geschichtet, in das Blotting-System eingesetzt und mit 4 °C-kaltem WB-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) aufgefüllt. Der Transfer wurde bei 100 V mit ca. 210 – 240 mA Stärke für 45 min

6) Experimenteller Teil

unter Rühren im Kühlschrank durchgeführt. Die Membranen wurden in 50mL-Falcon-Schraubgefäße überführt und für 5 min mit WB-Puffer auf dem Rollmischer gewaschen. Die Membranen wurden drei Mal mit TBS0.5% gewaschen und für eine Stunde mit Blockierungspuffer I (5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in TBS) inkubiert. Es wurde drei Mal mit TBS0.5% gewaschen und der primäre Antikörper, anti-EGFR oder anti-pEGFR jeweils mit anti-Tubulin, in einer Verdünnung von 1:1000 in Ak-Puffer I (5% BSA, 0.1% Tween-20 in TBS) hinzugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde erneut drei Mal mit TBS0.5% und nochmals zwei Mal für 5 min mit TBS0.5% gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, anti-Rabbit-HRP-Konjugat, erfolgte in einer 1:2000-Verdünnung in Ak-Puffer II (5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in TBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Nachdem drei Mal für je 5 min mit TBS0.5% gewaschen wurde, wurde die Membran unter Verwendung der Chemolumineszenz-Reagenzien SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate von *Thermo Fischer Scientific* ausgelesen. Beide Entwicklungslösungen wurden zu je 400 µL miteinander vermischt und auf die Membran gegeben. An der Image Station MM Pro wurde das Signal anschließend ausgelesen und die Rohdaten über das Programm ImageJ ausgewertet. Hierbei wurden jeweils die Banden des EGFR- bzw. pEGFR-Signals sowie die, des Tubulin-Signals markiert. Die korrekten Banden wurden über die farblich markierte Leiter zugeordnet. In jedem Blot wurde die EGFR/pEGFR-Bande ins Verhältnis zur zugehörigen Tubulin-Bande gesetzt. Diese Verhältnisse wurden nun wieder, wie in Gleichung 1 zusammengefasst, in Relation zueinander gesetzt, um die relative Phosphorylierung unter Normierung auf gleiche Tubulin-Konzentrationen zu erfassen.

$$\frac{pEGFR}{EGFR} = \frac{\frac{I_{pEGFR}}{I_{Tubulin(pEGFR)}}}{\frac{I_{EGFR}}{I_{Tubulin(EGFR)}}} = \frac{I_{pEGFR}}{I_{EGFR}} \cdot \frac{I_{Tubulin(EGFR)}}{I_{Tubulin(pEGFR)}} \quad \text{Gln. 1}$$

I_{pEGFR} – Intensität der pEGFR-Bande

$I_{Tubulin(pEGFR)}$ – Intensität der Tubulin-Bande im pEGFR-Blot

I_{EGFR} – Intensität der EGFR-Bande

$I_{Tubulin(EGFR)}$ – Intensität der Tubulin-Bande im EGFR-Blot

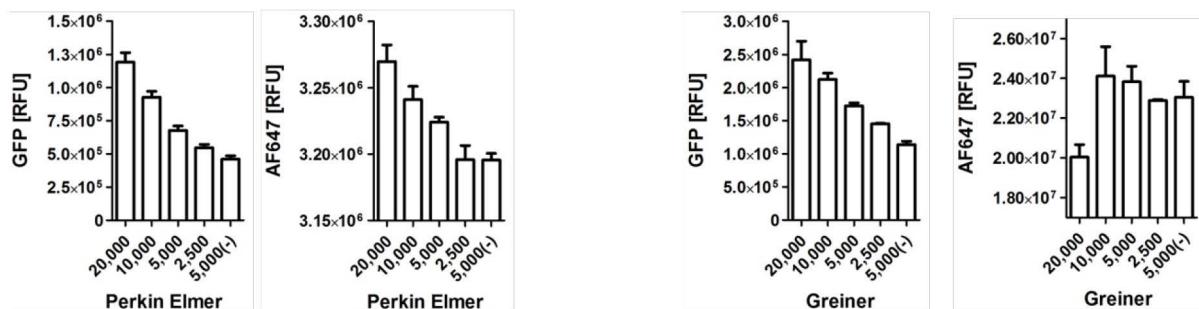
6.5.5) Immunfluoreszenz-Assay

Zu Beginn der Durchführung wurden zwei verschiedene Platten verglichen und eine Kalibrierung der Signalintensität von GFP und AF647 bei verschiedenen Zellzahlen vorgenommen. Die Platten der Hersteller *Perkin Elmer* und *Greiner* wurden so gewählt, dass sie eine Beschichtung für die Anhaftung von adhärenenten Zellen aufwiesen und durch schwarze Umrandung der Kavitäten für die Verwendung im fluoreszenten Auslesemodus geeignet waren. Platten von *Greiner* waren zudem in der Mikroskopie anwendbar. Zellzahlen von 2,500 – 20,000 Zellen je *well* wurden nach Poly-D-Lysin-Behandlung ausgesät, transfiziert und ohne Dimerisierungsexperiment dem Fixierungs- und Ausleseprotokoll über pEGFR- und AF647-

6) Experimenteller Teil

Antikörper unterzogen. Alle Messungen wurden als Dreifachreplikat durchgeführt. In der Mikroskopie erwiesen sich Zellzahlen von 5,000 – 10,000 als optimal, da andernfalls eine Überpopulation bzw. zu geringe Zelldichte zu verzeichnen war (Abb. 84B). Das GFP-Signal korrelierte auf beiden Platten gut mit den Zellzahlen, ergab also höhere Fluoreszenzintensitäten bei hohen Zellzahlen. Wurden 5,000 Zellen je *well* ohne Transfektion ausgesät, so lag das GFP-Signal etwas unter dem Signal für 2,500 Zellen je *well* mit Transfektion. Dies entspricht also ungefähr der Detektionsgrenze, an der das GFP-Signal nicht mehr vom Hintergrund unterscheidbar ist. Um ein möglichst zuverlässiges Signal ohne Überpopulation der Zellen zu ermöglichen, wurden 10,000 Zellen je *well* als optimal für alle folgenden Experimente erachtet. Es wurde ebenfalls das Niveau an pEGFR über Antikörpermarkierung mit AF647 ausgelesen, welches mit den absoluten Zellzahlen proportional verlaufen sollte, da eine hohe EGFR-Expression bei gleicher basaler Phosphorylierung eine hohe absolute Menge an pEGFR beinhalten sollte. Dies traf auf die Werte zu, die in den Platten von Perkin Elmer ausgelesen wurden. Bei *Greiner* kam es zu größeren relativen Schwankungen, wie an den höheren Fehlerbalken zu erkennen und einem inkonsistenten Verlauf. Insgesamt konnte aus diesen initialen Experimenten geschlussfolgert werden, dass das erarbeitete Protokoll zur Bestimmung der Menge an EGFR über das GFP-Signal und pEGFR über AF647-Signal anwendbar ist und Mikrotiterplatten von Perkin Elmer mit 10,000 Zellen je *well* zur Durchführung gut geeignet sind.

A) Kalibrierung der Zellzahlen für Platten von *Perkin Elmer* im Vergleich zu *Greiner*



B) Zellen in der Mikroskopie im Durchlicht und im YFP-Kanal (Platten: *Greiner*)

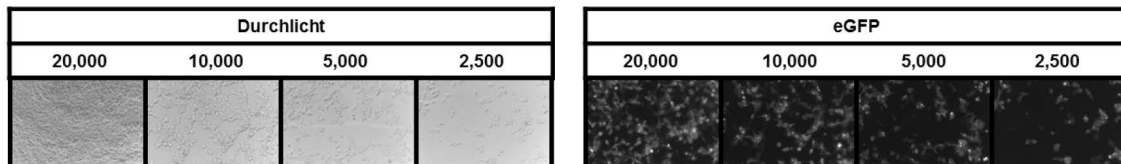


Abb. 84 Etablierung des Immunofluoreszenz-Assays. A) GFP- und AF647-Signale bei verschiedenen transfizierten Zellzahlen von 20,000 – 2,500 bzw. bei 5,000 Zellen ohne Transfektion (5,000(-)). B) Zusätzlich wurden die Populationen unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung im Durchlicht und im CFP-Kanal (überlappt mit GFP) betrachtet. Filtereinstellung im Plattenlesegerät: GFP $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$; AF: $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$. Mikroskopie: CFP-Kanal: $\lambda_{\text{ex}} = 438 \pm 24 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} > 458 \text{ nm}$.

6) Experimenteller Teil

Die Detektion der EGFR-Phosphorylierung in *Well*-Platten-Format wurde durch fluoreszente Markierung des phosphorylierten EGF-Rezeptors über Antikörper im Verhältnis zum GFP-Signal des Rezeptors durchgeführt. Der jeweilige Assay wurde durchgeführt und die Zellen wurden durch Zugabe von 100 µL Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS) je *well* fixiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die *wells* wurden drei Mal mit PBS gewaschen und mit je 100 µL Blockierungspuffer II (5% normales Ziegen Serum, 0.3% Triton in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem dreifachen Waschen mit TBS wurde der primäre pEGFR-Antikörper in einer Verdünnung von 1:800 in Ak-Puffer III (1% BSA, 0.3% Triton-X in TBS) in einem Volumen von je 50 µL je *well* hinzugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die *wells* dreifach mit TBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem AF647-markierten Anti-Rabbit-Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in Ak-Puffer III (1% BSA, 0.3% Triton-X in TBS) mit je 50 µL inkubiert. Nachdem drei Mal für je 5 min mit TBS gewaschen wurde, wurde die Platte im Lesegerät im GFP- und AF647-spezifischen Kanal ausgelesen (GFP: $\lambda_{\text{ex}} = 480 \pm 31$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm; AF647: $\lambda_{\text{ex}} = 640 \pm 10$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 665$ nm).

6.5.6) Dimerisierungsexperimente

Dimerisierungsexperimente für den Nachweis im Western Blot:

1) Erste Dimerisierungsexperimente (Abb. 46A)

Die Kavitäten einer 6-*well*-Mikrotiterplatte für die Zellkultur wurden für 10 min mit einer 0.01%-igen Poly-D-Lysin-Lösung behandelt, die Lösung abgenommen und die Platte an Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet. Es wurden je 300,000 HEK293-Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht bei 37 °C gehalten. Zur Transfektion wurden die Zellen über eine Stunde mit je 250 ng Vektor-DNA und 2.5 µL Lipofektamin®2000 in 500 µL Opti-MEM® behandelt und über Nacht zur Expression in serumhaltigem DMEM im Inkubator bei 37 °C gehalten. Das Medium wurde durch serumfreies DMEM ersetzt und die Zellen im Zuge des „Aushungerns“ für 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde über Fluoreszenzmikroskopie am Axio Observer A.1 von Zeiss sichergestellt. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 500 µL 0.1 mM TCEP in PBS-Puffer für 10 min behandelt. Der Überstand wurde abgenommen und 100 nM PNA-Donor in je 500 µL PBS-Puffer bei pH 7.0 für 5 min hinzugegeben und die Zellen anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Je nach Probe wurden 500 µL reinen PBS-Puffers oder PBS-Puffer mit 500 nM Brücken-DNA für 2 min auf die Zellen gegeben und anschließend 1 µL EGF aus einer 10 µM-Stammlösung hinzugegeben und die Lösung mit einer Pipette gemischt. Die Zellen wurden für weitere 10 min bei 37 °C gehalten, bevor sie lysiert und analysiert wurden.

2) Dimerisierungsexperimente Blot I und II (Abb. 46B)

Die Kavitäten einer 24-*well*-Mikrotiterplatte für die Zellkultur wurden für 10 min mit einer 0.01%-igen Poly-D-Lysin-Lösung behandelt, die Lösung abgenommen und die Platte an Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet. Es wurden je 100,000 HEK293-Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht bei 37 °C gehalten. Die Transfektion wurde mit je 250 ng Vektor-DNA und 2.5 µL Lipofektamin®2000 in 50 µL Opti-MEM® für eine Stunde durchgeführt und die Zellen über Nacht zur Expression in DMEM mit 10% FBS im Inkubator bei 37 °C gehalten. Das Medium wurde auf serumfreies DMEM gewechselt und die Zellen für 6 h gehungert. Die Transfektionseffizienz wurde über Fluoreszenzmikroskopie am Axio Observer A.1 von Zeiss sichergestellt. Es wurden je 200 µL 0.1 mM TCEP in PBS-Puffer für 10 min auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde abgenommen und entweder 100 nM PNA-Donor in 200 µL PBS-Puffer pH 7.0 oder reiner PBS-Puffer pH 7.0 für 5 min hinzugegeben und die Zellen anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Je nach Probe wurden 200 µL reinen PBS-Puffers oder PBS-Puffer mit 200 nM Brücken-DNA mit acht Nukleotiden Abstandhalter für 2 min auf die Zellen gegeben und anschließend gegebenenfalls 10 µL EGF aus einer 1 µM-Stammlösung hinzugegeben und die Lösung mit einer Pipette gemischt. Die Zellen wurden für weitere 10 min bei 37 °C gehalten, bevor sie lysiert und analysiert wurden.

3) Dimerisierungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen an DNA (Abb. 46C)

Die Kavitäten einer 24-*well*-Mikrotiterplatte für die Zellkultur wurden für 10 min mit einer 0.01%-igen Poly-D-Lysin-Lösung behandelt, die Lösung abgenommen und die Platte an Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet. Es wurden je 100,000 HEK293-Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht bei 37 °C gehalten. Die Transfektion wurde mit je 250 ng Vektor-DNA und 2.5 µL Lipofektamin®2000 in 50 µL Opti-MEM® für eine Stunde durchgeführt und die Zellen über Nacht zur Expression in DMEM mit 10% FBS im Inkubator bei 37 °C gehalten. Das Medium wurde auf serumfreies DMEM gewechselt und die Zellen für 6 h gehungert. Die Transfektionseffizienz wurde über Fluoreszenzmikroskopie am Axio Observer A.1 von Zeiss sichergestellt. Es wurden je 200 µL 0.1 mM TCEP in PBS-Puffer für 10 min auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde abgenommen und entweder 100 nM PNA-Donor in 200 µL PBS-Puffer pH 7.0 oder reiner PBS-Puffer pH 7.0 für 5 min hinzugegeben und die Zellen anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Je nach Probe wurden 200 µL reinen PBS-Puffers oder PBS-Puffer mit Brücken-DNA für 2 min auf die Zellen gegeben. Die Konzentration der Brücken-DNA mit acht Nukleotiden Abstandhalter betrug 50 nM, 5 nM oder 0.1 nM. Es wurden 10 µL EGF aus einer 1 µM-Stammlösung hinzugegeben und die Lösung mit einer Pipette gemischt. Die Zellen wurden für weitere 10 min bei 37 °C gehalten, bevor sie lysiert und analysiert wurden.

Dimerisierungsexperimente im Immunofluoreszenz-Assay:

1) Experimente zur induzierten Dimerisierung (Abb. 48A und B)

Es wurde die 96-well-Mikrotiterplatten CulturePlate-96 von *Perkin Elmer* verwendet und mit 0.01%-iger Poly-D-Lysin-Lösung für 10 min vorbehandelt, getrocknet und mit je 10,000 HEK293-Zellen je Kavität besetzt. Nach Inkubation bei 37 °C in DMEM mit 10% FBS über Nacht wurden die Zellen mit je 100 ng Vektor-DNA und 1 µL Lipofektamin®2000 in 50 µL Opti-MEM® für eine Stunde transfiziert und in DMEM mit 10% FBS über Nacht kultiviert. Das Medium wurde gegen serumfreies DMEM getauscht und die Zellen für 6 h gehungert. Vor dem Assay wurde das Medium gegen TBS gewechselt und das GFP-Signal im Plattenleser gemessen, um die erfolgreiche Transfektion zu verifizieren. Die Zellen wurden für 5 min mit je 50 µL einer 0.1 mM TCEP-Lösung in PBS-Puffer inkubiert und anschließend mit je 50 µL einer 100 nM PNA-Donor-Lösung in PBS-Puffer pH 7.0 bzw. dem reinen Puffer für 4 min behandelt. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, bevor die DNA hinzugegeben wurde. Dabei wurde die Brücken-DNA in einer Konzentration von 100 nM und die monovalente DNA in 200 nM verwendet. Die restlichen Zellen wurden mit reinem Puffer inkubiert und nach 2 min zur Stimulation mit 12 µL einer 0.1-mikromolaren EGF-Lösung versetzt. Nach 10 bzw. 20 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und nach oben beschriebenem Protokoll analysiert.

2) Experimente zur inhibierten Dimerisierung (Abb. 48D)

Es wurde die 96-well-Mikrotiterplatten CulturePlate-96 von *Perkin Elmer* verwendet und mit 0.01%-iger Poly-D-Lysin-Lösung für 10 min vorbehandelt, getrocknet und mit je 10,000 HEK293-Zellen je Kavität besetzt. Nach Inkubation bei 37 °C in DMEM mit 10% FBS über Nacht wurden die Zellen mit je 100 ng Vektor-DNA und 1 µL Lipofektamin®2000 in 50 µL Opti-MEM® für eine Stunde transfiziert und in DMEM mit 10% FBS über Nacht kultiviert. Das Medium wurde gegen serumfreies DMEM getauscht und die Zellen für 6 h gehungert. Vor dem Assay wurde das Medium gegen TBS gewechselt und das GFP-Signal im Plattenleser gemessen, um eine Transfektion sicherzustellen. Die Zellen wurden für 5 min mit je 50 µL einer 0.1 mM TCEP-Lösung in PBS-Puffer inkubiert und anschließend mit je 50 µL einer 100 nM PNA-Donor-Lösung in PBS-Puffer pH 7.0 bzw. dem reinen Puffer für 4 min behandelt. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, bevor die DNA in einem Volumen von 50 µL hinzugegeben wurde. DNA-Lösungen wurden so in PBS-Puffer hergestellt, dass die Konzentration an PNA-Bindungssequenzen je 200 nM betrug. Die restlichen Zellen wurden mit reinem Puffer inkubiert und nach 2 min wurde zur Stimulation 12 µL einer 0.1-mikromolaren EGF-Lösung hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und nach oben beschriebenem Protokoll analysiert.

Dimerisierungsexperimente in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 49):

Die mikroskopische Untersuchung des Internalisierungsvorgangs wurde am Inversmikroskop IX83 von *Olympus* unter Verwendung der Kanäle DAPI (Hoechst33342), YFP (eGFP) und TRITC (Cy3), sowie der Betrachtung im Durchlicht durchgeführt. Als Träger wurden 8-well μ -slides mit der Beschichtung ibiTreat® von *ibidi* genutzt und diese eingangs mit 0.01%-iger Poly-D-Lysin-Lösung für 10 min vorbehandelt, die Lösung entfernt und die Träger getrocknet, bevor HEK293-Zellen mit je 10,000 Zellen je Kavität ausgesät wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C in DMEM mit 10% FBS über Nacht kultiviert und am Folgetag mit je 200 ng Vektor-DNA und 2 μ L Lipofektamin®2000 in 200 μ L Opti-MEM® für eine Stunde bei 37 °C transfiziert und über Nacht in DMEM mit 10% FBS gehalten. Je nach Versuch, wurde das Medium vor dem Experiment auf serumfreies DMEM gewechselt. Jedes well wurde separat angefärbt, dimerisiert, markiert, stimuliert und ausgelesen, um die zeitabhängige Messung einer bestimmten, ausgewählten Population zu ermöglichen. Die Zellkerne wurden angefärbt, indem 2 μ L einer 0.5 mg/mL-Lösung Hoechst33342 auf 200 μ L PBS-Puffer verdünnt und für 10 min bei 37 °C auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden gewaschen, für 2 min mit einer Lösung von 0.1 mM TCEP in PBS inkubiert, erneut gewaschen der PNA-Donor in 100 nM Konzentration in PBS-Puffer pH 7.0 für 4 min hinzugegeben. Die Zellen wurden erneut gewaschen und für 5 min in einer PBS-Lösung mit 200 nM verbrückender oder monovalenter DNA bei 37 °C gehalten. Je nach Experiment wurde dieser Lösung eine definierte Konzentration an Wachstumsfaktor EGF beigefügt. Die Zellen wurden erneut mit PBS-Puffer gewaschen und in der Mikroskopie betrachtet.

7) Anhang

7.1) Abkürzungsverzeichnis

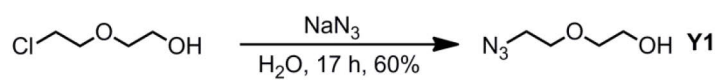
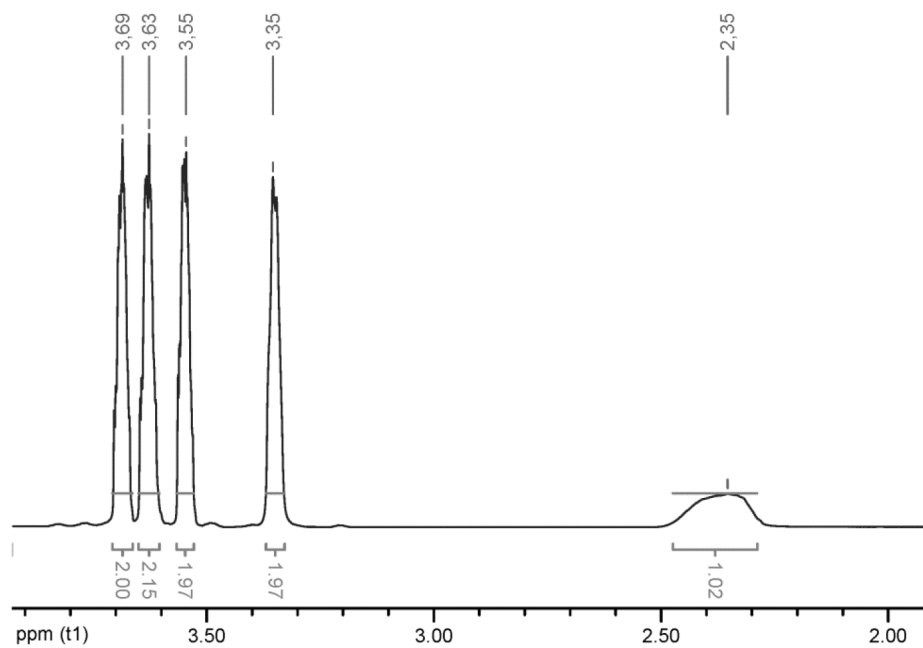
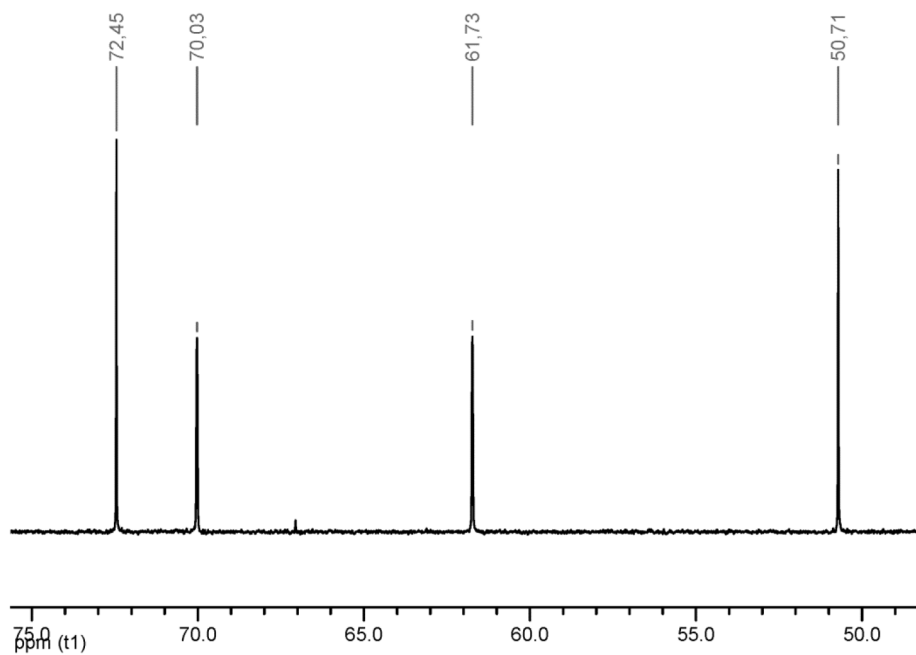
| | |
|----------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| Äq. | Äquivalente |
| AF568 | Alexa Fluor 568 |
| AF647 | Alexa Fluor 647 |
| ALO | <i>arylless cyclooctyne</i> (2-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)essigsäure) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BG | Benzylguanin |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| Bhoc | Benzhydrioxycarbonyl |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| calc. | <i>calculated</i> (errechnet) |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl |
| CID | <i>chemical inducer of dimerization</i> |
| Cou | Coumarin343 |
| CPP | <i>cell-penetrating peptide</i> |
| CuAAC | <i>copper catalyzed alkyne azide cycloaddition</i> |
| DARPs | <i>designed ankyrin repeat proteins</i> |
| DCM | Dichlormethan |
| Deg | Diethylenglykol |
| DIC | Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> |
| <i>E. Coli</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor) |
| eGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) |
| em | <i>emission</i> (Emission) |
| ET | Endothelin |
| em / ex | <i>emission</i> (Emission) / <i>excitation</i> (Anregung) |
| FAM | 5,6-Carboxyfluorescein |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum) |
| Fmoc | Fluorenylmethoxycarbonyl |
| gef / ges | gefunden / gesucht |
| Gln. | Gleichung |
| GPCR | <i>G-protein coupled receptor</i> |
| HA | Hämagglutinin |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| HCTU | 2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat |
| HGF | Hepatozyten-Wachstumsfaktor |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HRP | <i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase) |

7.1) Abkürzungsverzeichnis

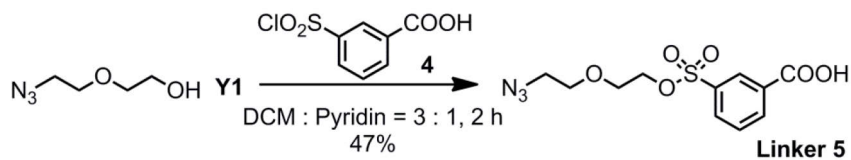
| | |
|--------------|---|
| ITAM | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| LDT | <i>ligand-directed tosylate chemistry</i> |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| MALDI-TOF | <i>matrix assisted laser desorption / ionisation – time of flight</i> |
| MBHA | 4-Methylbenzylhydraminhydrochlorid |
| Mmt | Methoxytrityl-[(4-methoxyphenyl)diphenylmehtyl] |
| MPA | Mercaptopropionsäure |
| MPAA | Mercaptophenylelessigsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMM | N-Methylmorpholin |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> |
| nt | Nukleotid |
| PAINT | <i>point accumulation in nanoscale topography</i> |
| PALM | <i>photoactivated lokalization microscopy</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PhiPr | 2-Phenylisopropylester |
| PNA | <i>peptide nucleic acid</i> |
| pNPY | porkines Neuropeptid Y |
| POI | <i>protein of interest</i> |
| PyBOP | Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat |
| RIPA | Radioimmunopräzipitations-Assay |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RTK | Rezeptor-Tyrosin-Kinase |
| SDS-PAGE | <i>sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis</i> |
| SELEX | <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> |
| SPAAC | <i>strain promoted azide-alkyne cycloaddition</i> |
| SPPS | <i>solid phase peptide synthesis</i> |
| SRM | <i>super-resolution microscopy</i> |
| STED | <i>stimulated emission depletion</i> |
| STORM | <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i> |
| TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphan |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFMSA | Trifluormethansulfonsäure |
| TGF α | <i>transforming growth factor α</i> |
| TGR | Tentagel-Rinkamid |
| THPTA | Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin |
| TIS | Triisopropylsilan |
| TMR | 5,6-Carboxytetramethylrhodamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisothiocyanat |
| Trt | Trityl |
| UPLC™ | <i>ultra performance liquid chromatography</i> |

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

7.2.1) NMR-Analyse der Linker und Bausteine

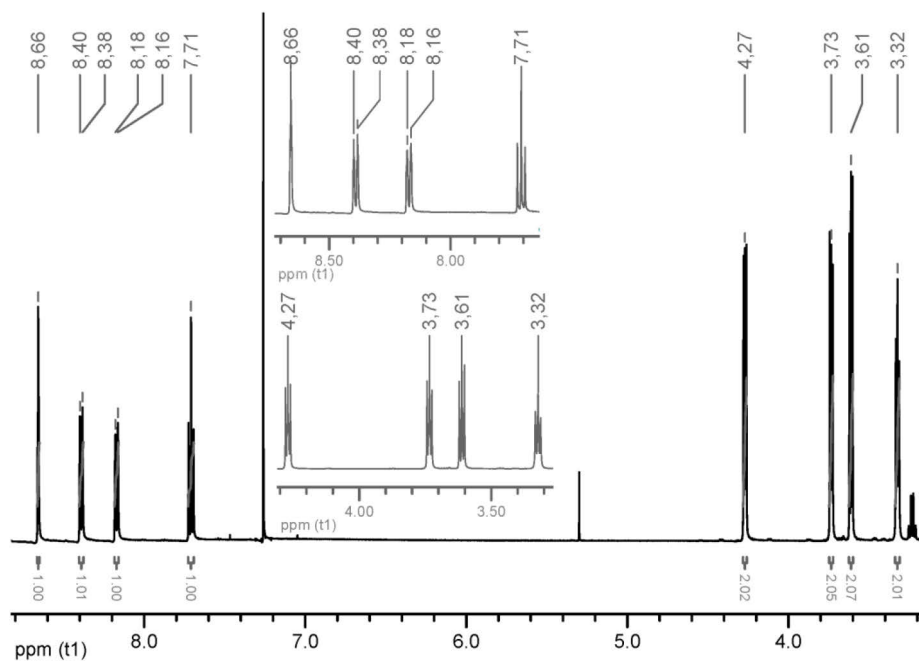
Azidoethoxyethanol Y1 ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3)

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

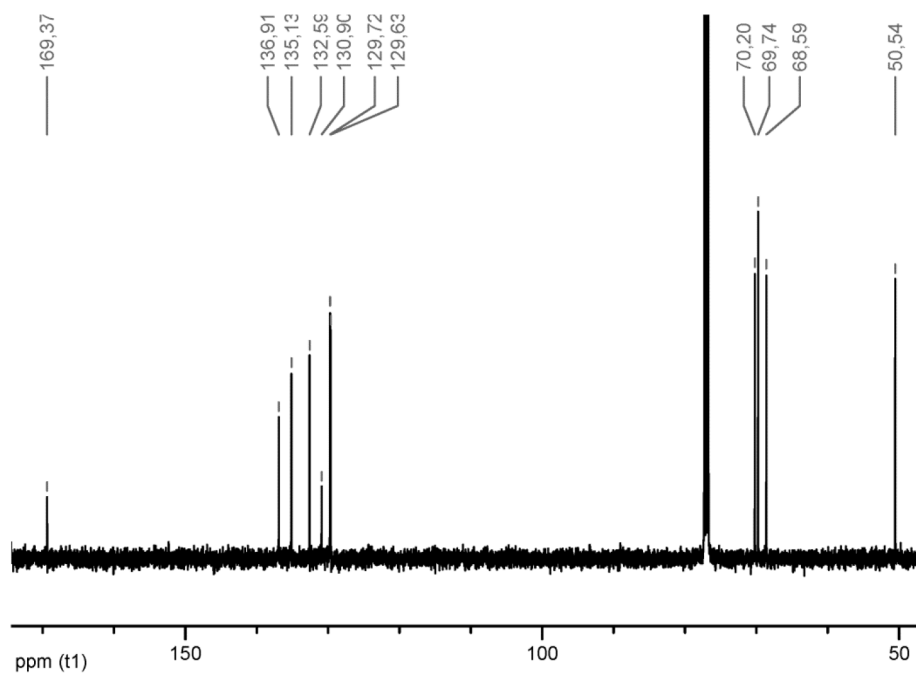


3-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)sulfonylbenzoesäure 5

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)

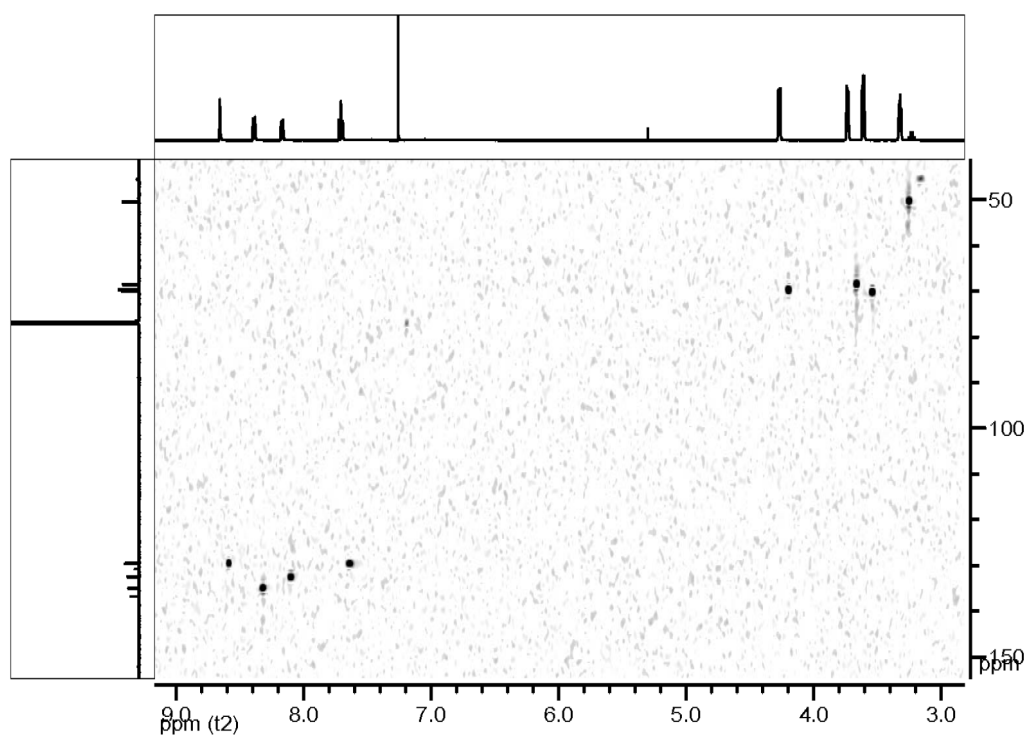


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

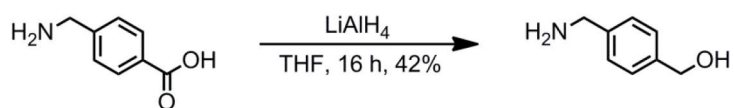


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

C,H-COSY

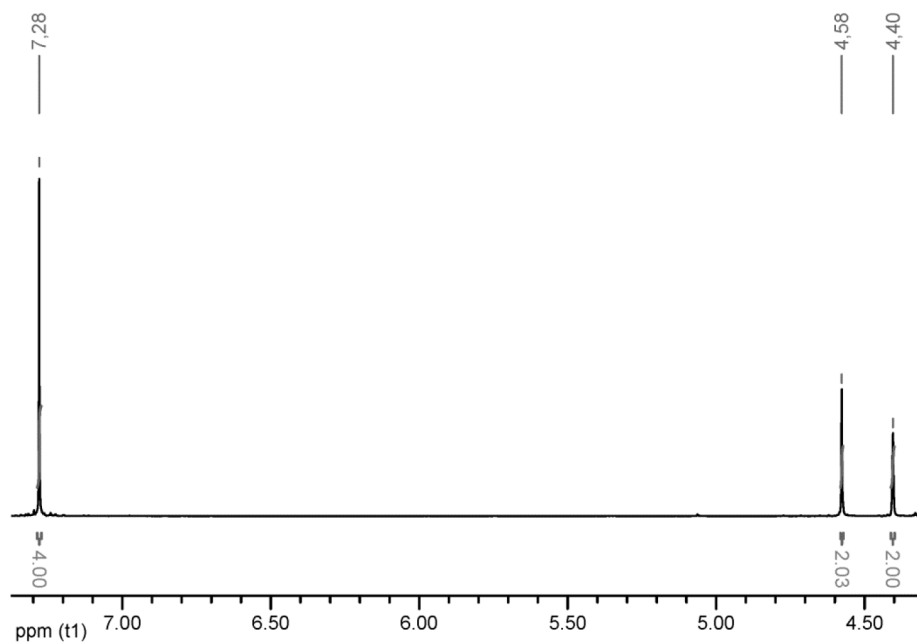


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

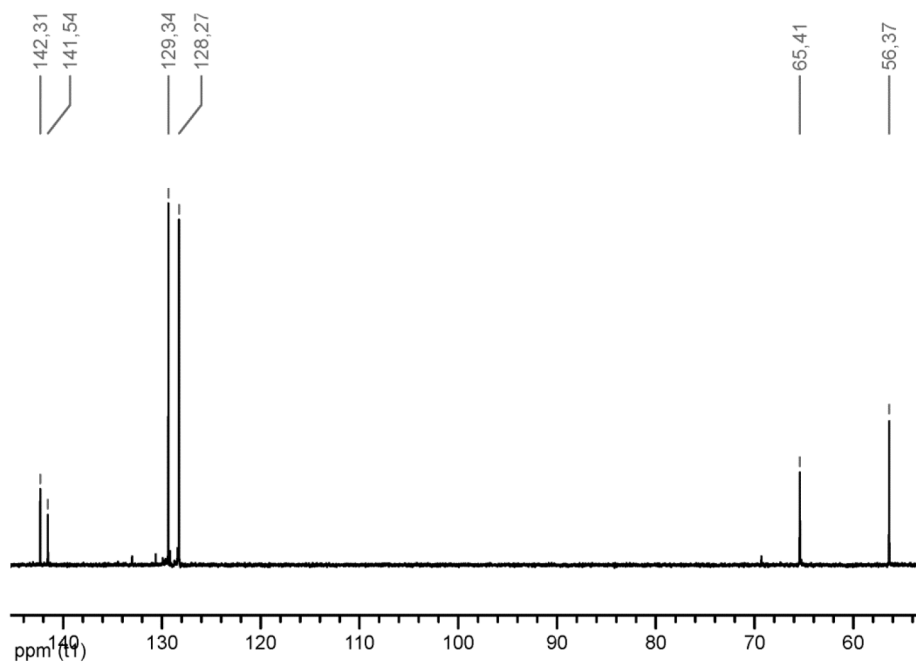


p-Aminomethylbenzylalkohol

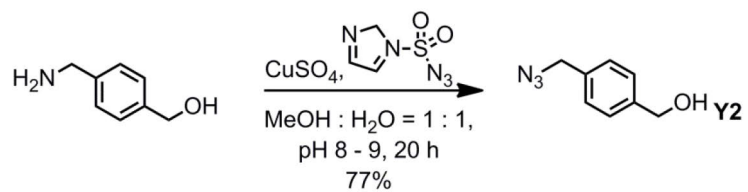
$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

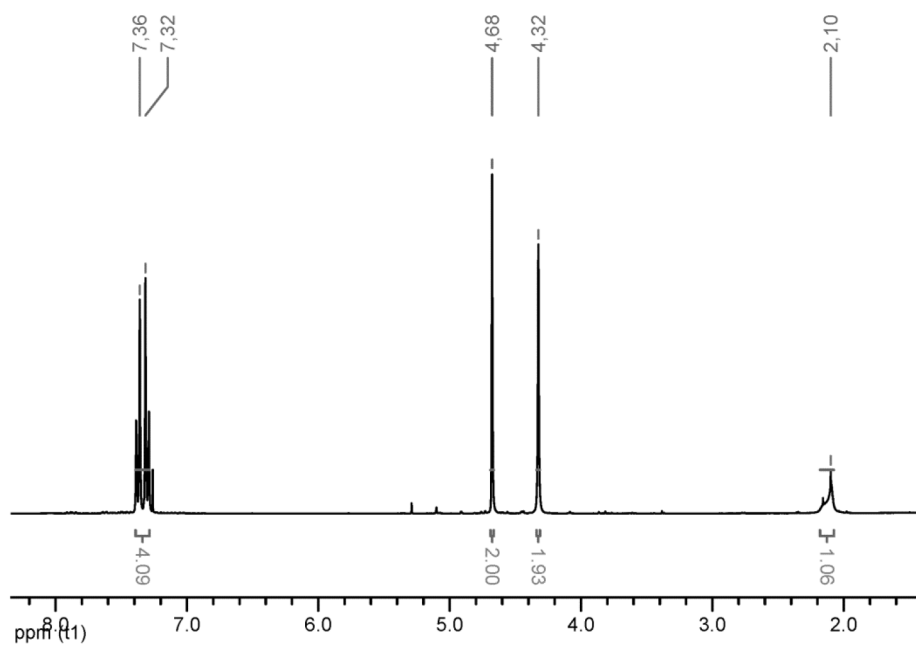


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

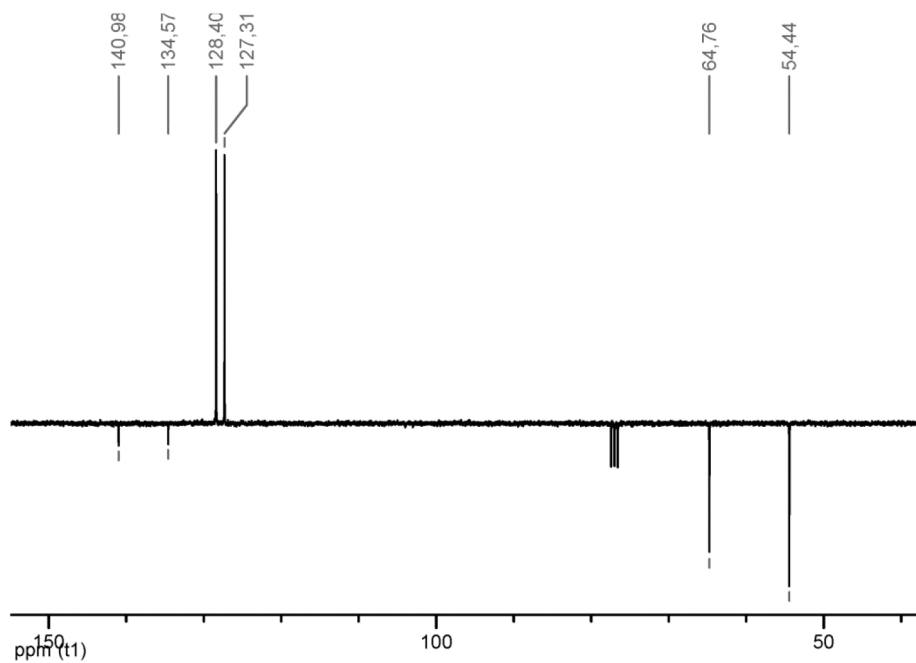


p-Azidomethylbenzylalkohol Y2

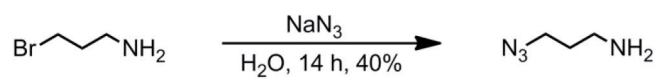
$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-APT-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

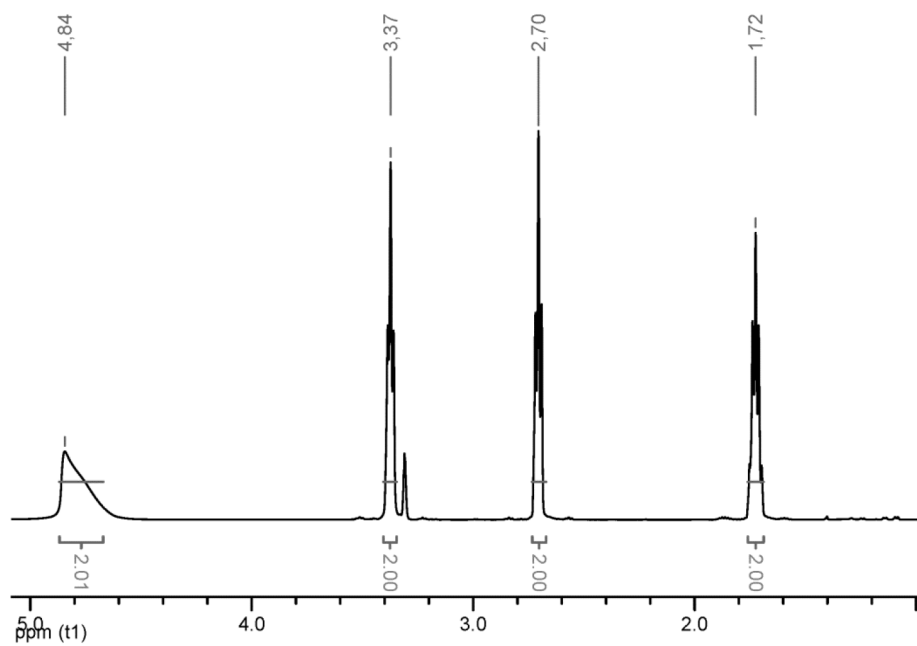


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

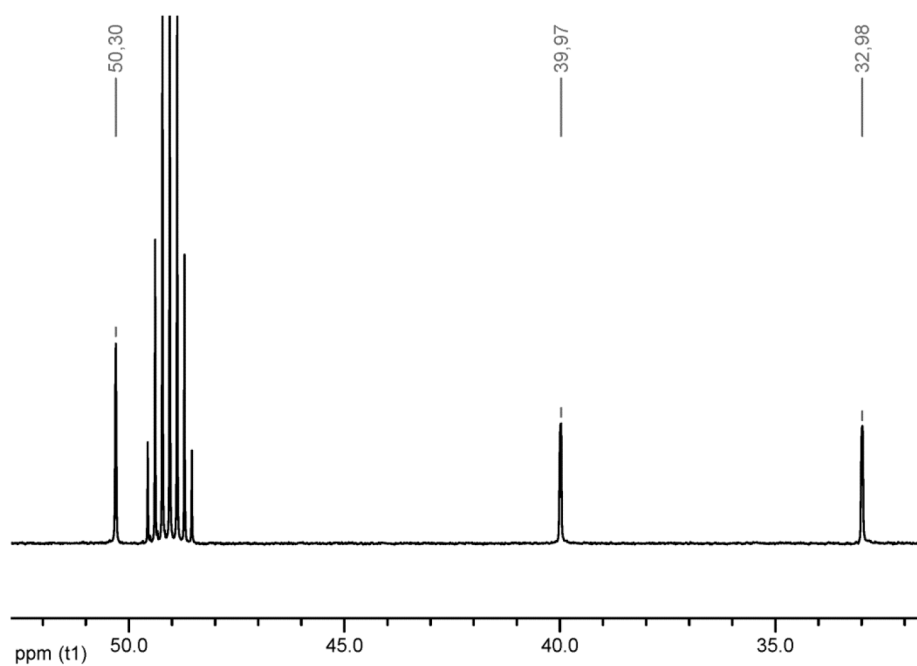


1-Amino-3-azidopropan

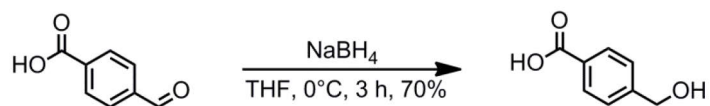
$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

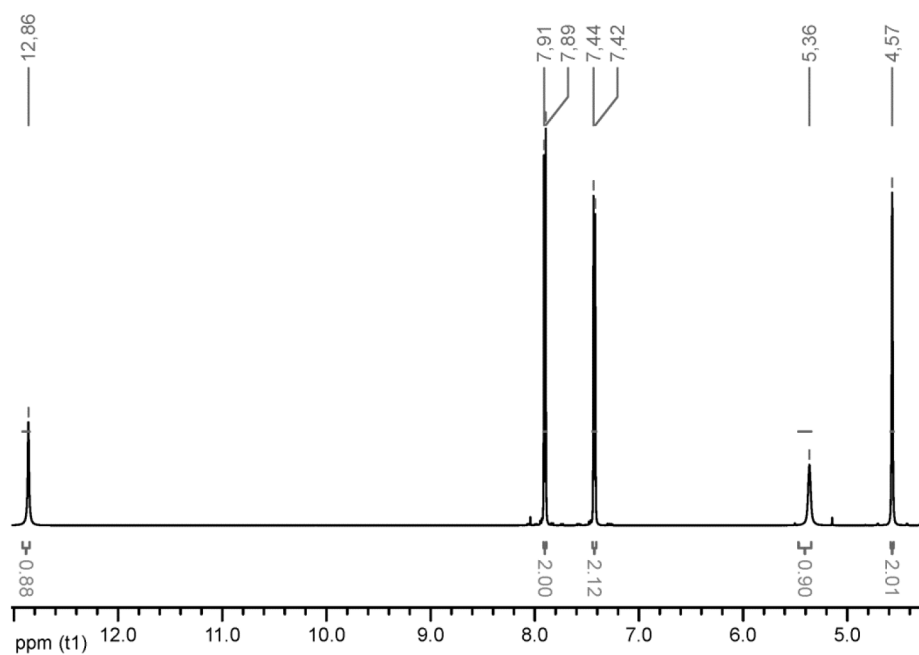


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

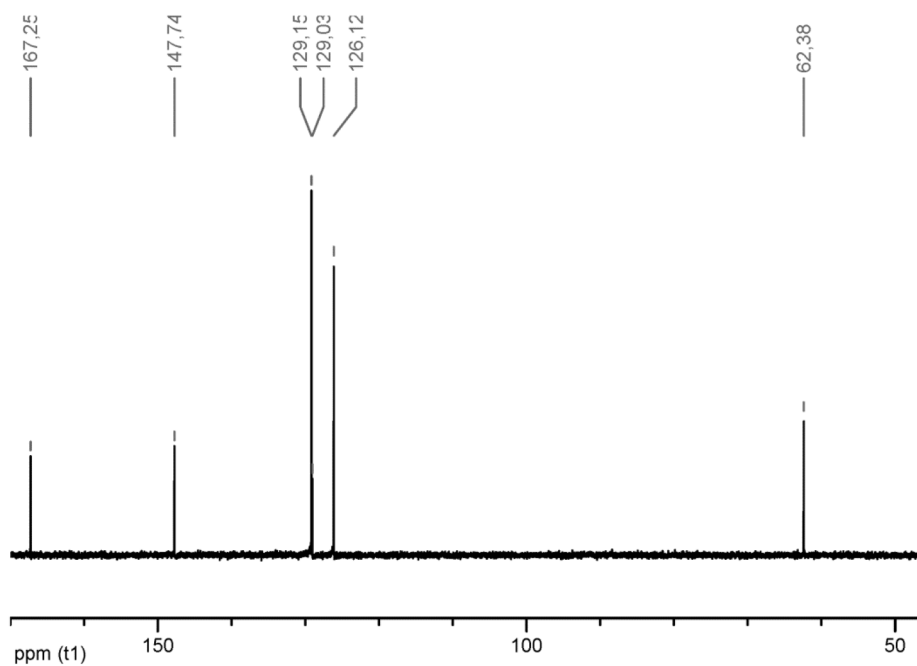


p-Hydroxymethylbenzoesäure

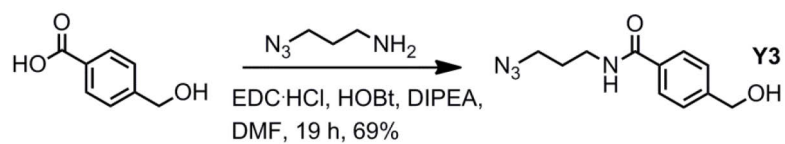
$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]

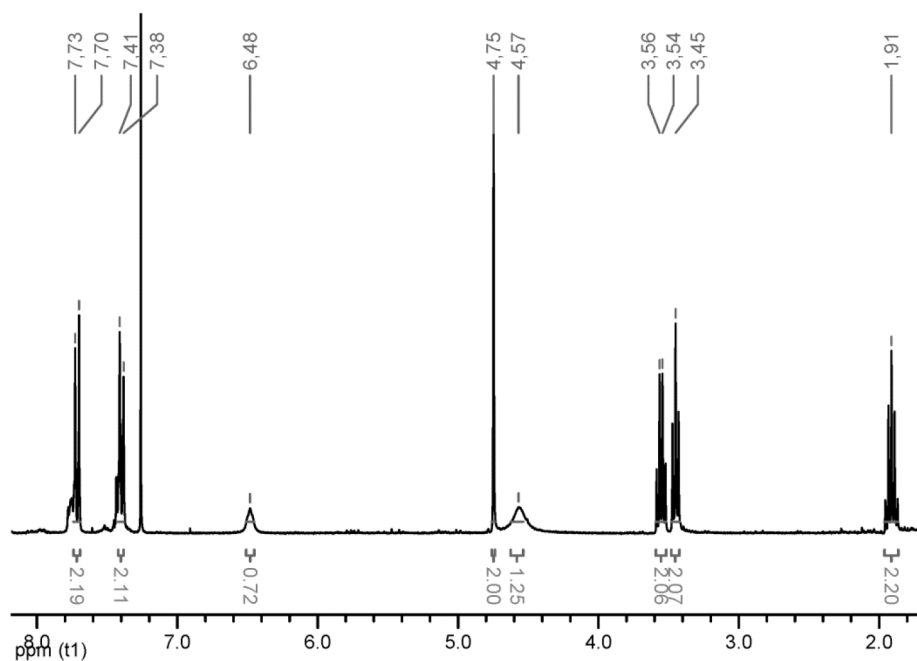


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

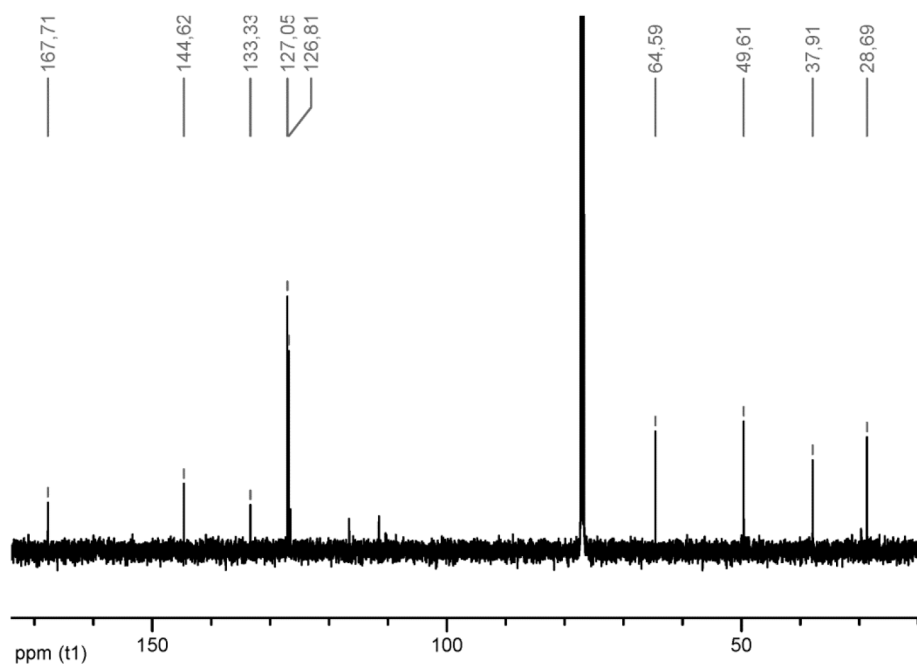


N-Azidopropyl-*p*-hydroxymethylbenzamid Y3

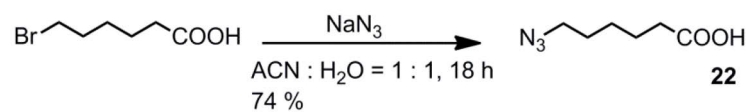
$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

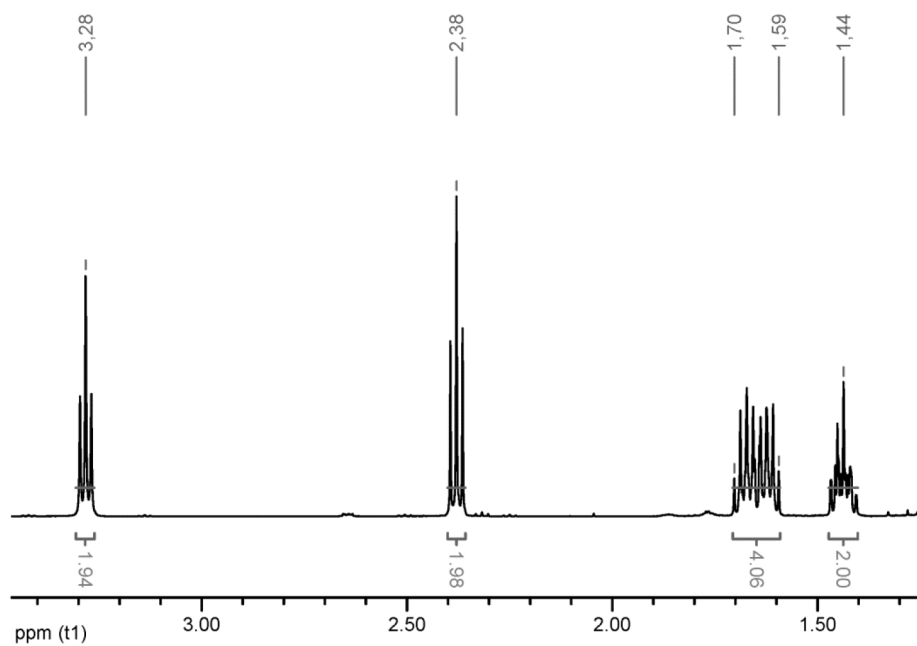


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

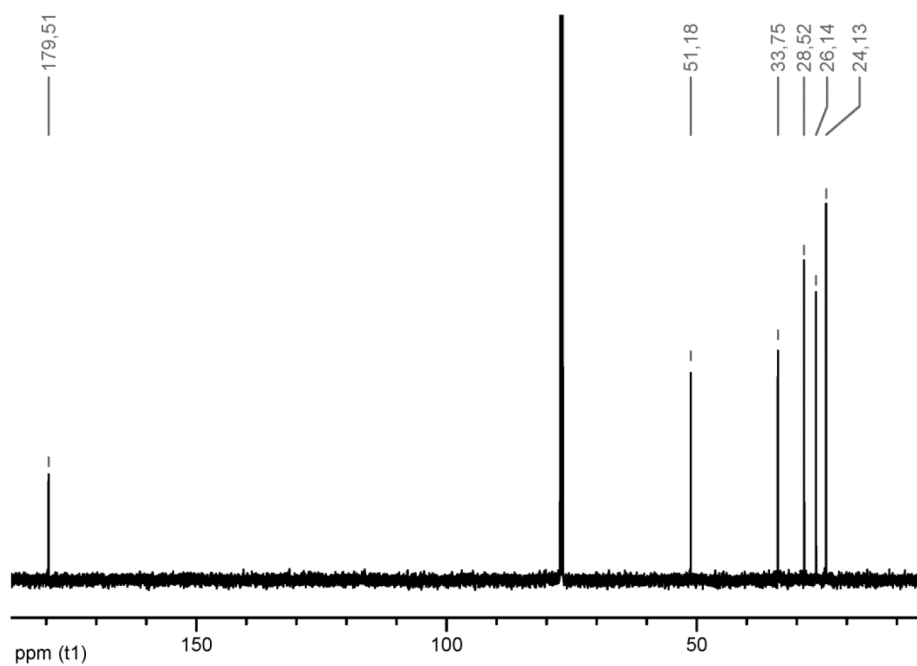


Azidohexansäure **22**

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)



$^{13}\text{C-NMR}$ (175MHz, CDCl_3)



7.2.2) Massenspektrometrische und Chromatographische Analytik

Peptide, Proteine, PNA-Oligomere und Konjugate wurden über HPLC gereinigt und die entsprechenden Gradienten zur jeweiligen Verbindung hier angegeben. Zur Analyse der Verbindungen sind, sofern nicht anders angegeben, hier die Chromatogramme gemessen an der UPLC™-MS mit einem Gradienten von 3 – 90% Laufmittel B gezeigt. Zur massenspektrometrischen Analyse der hergestellten Verbindungen wurden die gesuchten Molekülmassen (M_{calc}) aus den einzelnen Atomgewichten errechnet. Dabei wurde die Masse aller Isotopen in ihrer natürlichen Verteilung genutzt (nicht monoisotopisch). Die durch Ionensprayionisation zu erwartenden Massen (ESI_{ges}) wurden durch die Gleichung 12 ermittelt, in der n die Mehrfachprotonierung wiedergibt.

$$\text{ESI}_{\text{ges}} = (M_{\text{calc}} + n)/n \quad \text{Gln. 12}$$

Die Quantifikation der Verbindungen erfolgte aus verdünnten Lösungen über die Absorption wie in Kapitel 6.3.8 beschrieben. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten sind an jeder Verbindung entsprechend angegeben und wurden zur Berechnung der Absorption nach Lamber-Beer-Gesetz genutzt (Gln. 4).

7.2.2.1) Peptide und Proteine

Peptide aus Kapitel 4.1)

Linker5-GLAG (9)

HPLC-Gradient:

30 – 90% Laufmittel B

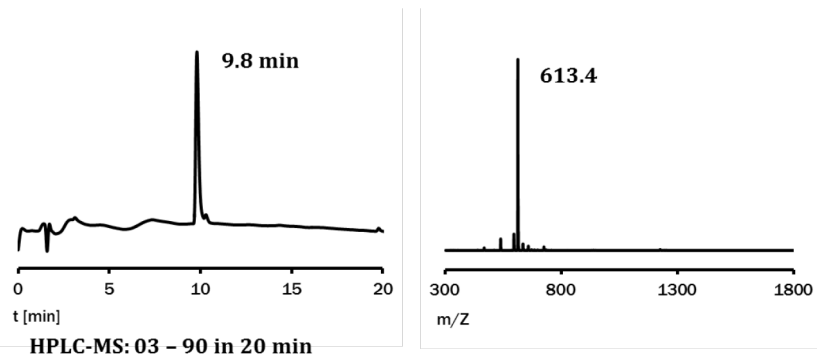
$M_{\text{calc}} = 612.66 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [613.7]^{+1}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [613.4]^{+1}$

Ausbeute: 38% (150 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 13,574 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$

**Linker5-(KIAALKE)₃G (10)**

HPLC-Gradient:

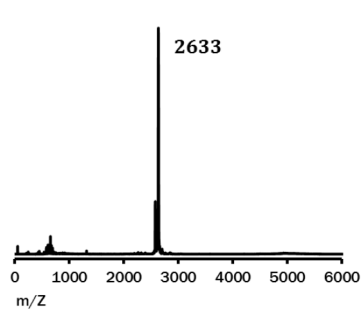
20 – 60% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2633.16 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 2633^{[\text{M}+\text{H}]^{+}}$

Ausbeute: 32% (960 nmol) (auf K3-baldenes Harz bezogen)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 29,165 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$

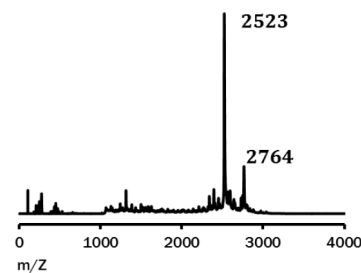


7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Linker7-(KIAALKE)₃G

$M_{\text{calc}}(\text{Produkt}) = 2736.3 \text{ g/mol}$

$M_{\text{calc}}(\text{Hydrolyse}) = 2520.0 \text{ g/mol}$



Linker5-Ahx-(KIAALKE)₃G

HPLC-Gradient:

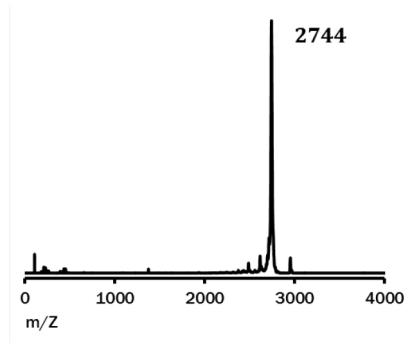
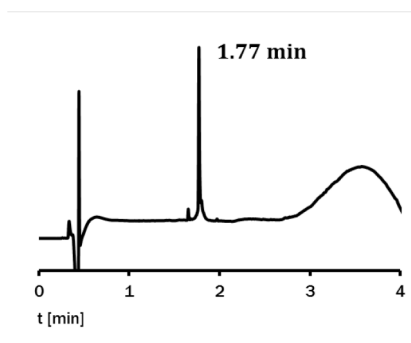
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2746.32 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 2744^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 21% (138 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 29,165 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



N₃(CH₂)₅(CO)-MPA-(KIAALKE)₃G (**23**)

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2563.15 \text{ g/mol}$

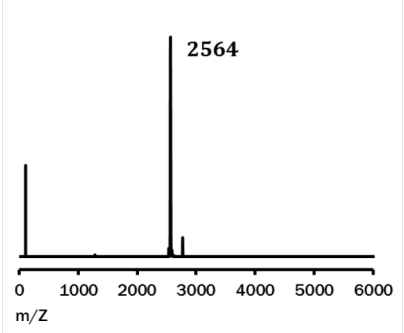
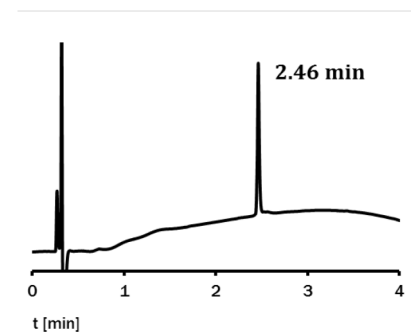
MALDI-TOF_{gef} = 2564^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 20% (100 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 22,568 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(auf K3-baldenes Harz

bezogen)



N₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-(KIAALKE)₃G (**24**)

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2625.23 \text{ g/mol}$

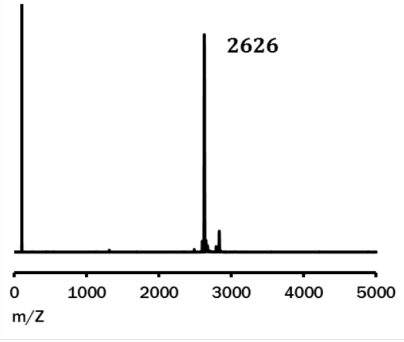
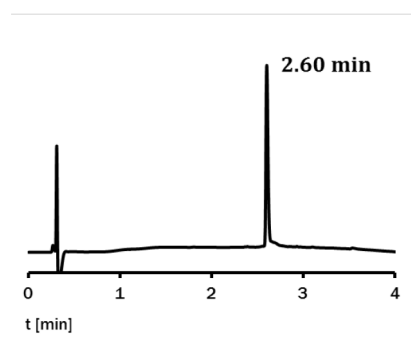
MALDI-TOF_{gef} = 2626^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 17% (61 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 27,411 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(auf K3-baldenes Harz

bezogen)



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

$\text{N}_3(\text{CH}_2)_5(\text{CO})\text{-MPAA-Ahx-(KIAALKE)}_3\text{G}$ (**31**)

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2738.38 \text{ g/mol}$

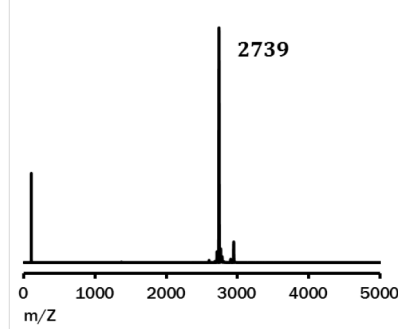
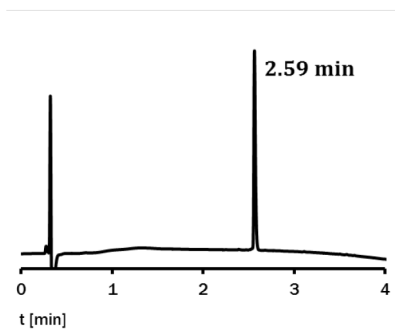
$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 2739^{[\text{M}+\text{H}]^+}$

Ausbeute: 48% (206 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 28,396 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(auf K3-baldenes Harz

bezogen)



$\text{C-(EIAALEK)}_3\text{G}$ (**36**)

HPLC-Gradient:

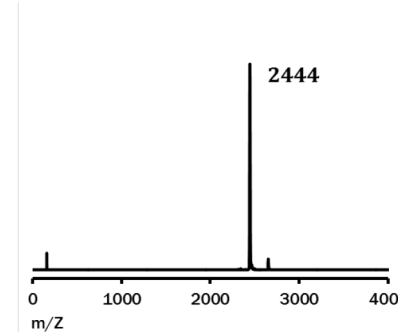
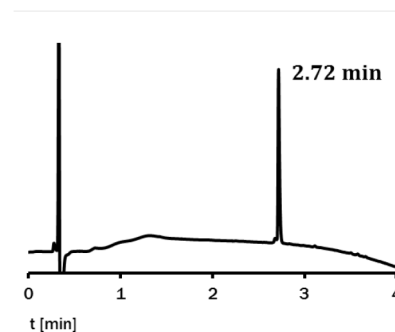
30 – 80% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2441.84 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 2444^{[\text{M}+\text{H}]^+}$

Ausbeute: 33% (430 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 22,528 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



$\text{K-(EIAALEK)}_3\text{G}$

HPLC-Gradient:

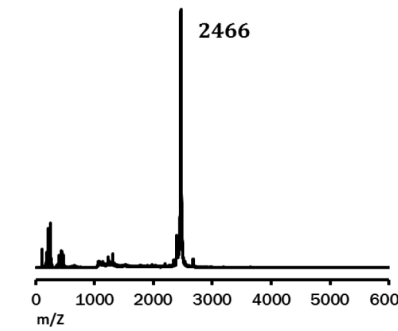
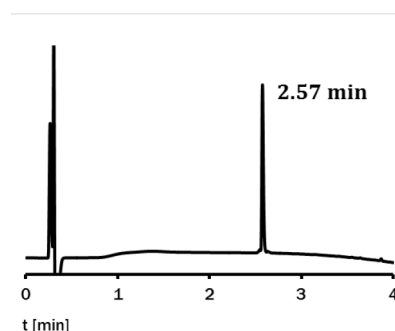
30 – 80% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2466.87 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 2466^{[\text{M}+\text{H}]^+}$

Ausbeute: 18% (90 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 22,344 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



$\text{CGG-(EIAALEK)}_3\text{G}$ (**39**)

HPLC-Gradient:

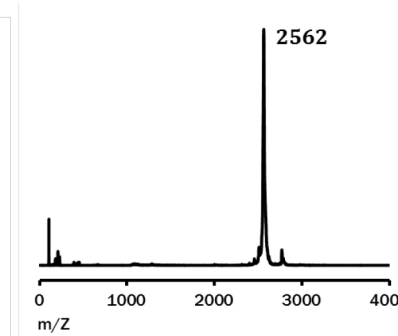
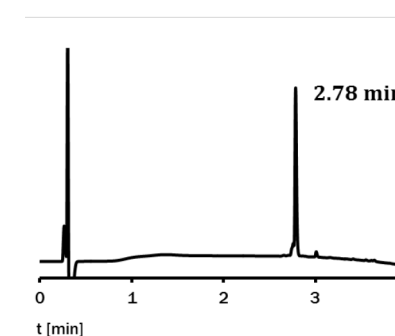
30 – 80% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 2555.94 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 2562^{[\text{M}+\text{H}]^+}$

Ausbeute: 50% (450 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 24,416 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



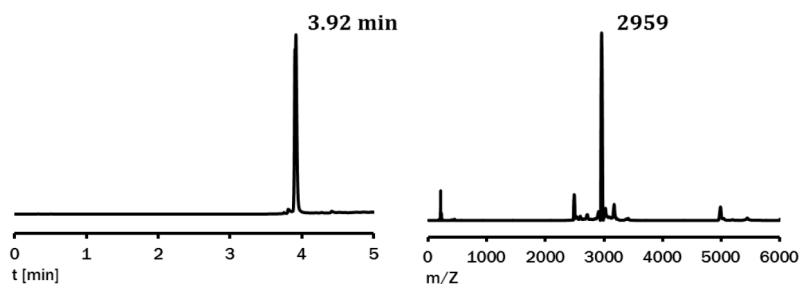
*Peptide aus Kapitel 4.2)***TMR-Gly-MPAA-(KIAALKE)₃G (45)**

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2955.76 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 2959^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 7% (51 nmol)

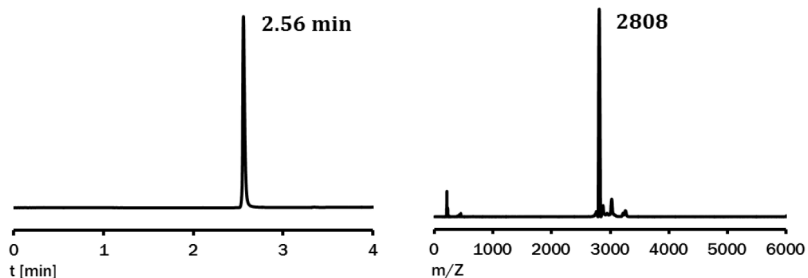
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 32,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **TMR-Gly-(KIAALKE)₃G**

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2805.37 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 2808^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 11% (99 nmol)

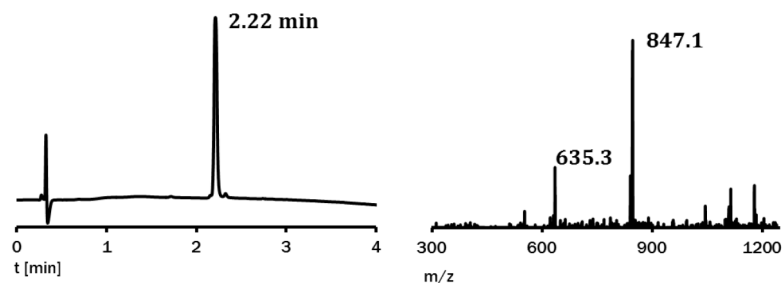
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 32,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ *Peptide aus Kapitel 4.4)***C-ENALEQ ENAALEE EIAQLEY (62)**

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2536.68 \text{ g/mol}$ ESI_{ges} = [846.6]³⁺, [635.2]⁴⁺ESI_{gef} = [847.1]³⁺, [635.3]⁴⁺

Ausbeute: 16% (1.6 μmol)

 $\epsilon_{214\text{nm}} = 27,458 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

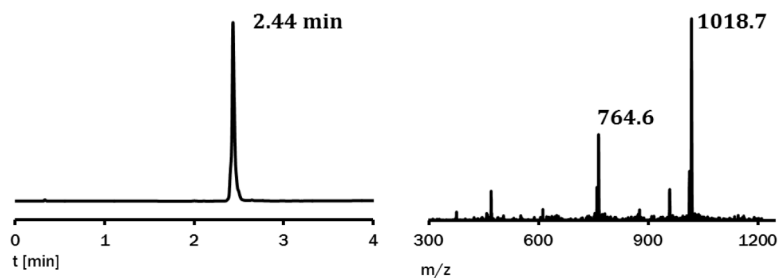
TMR-G-MPAA-ENALQEQ ENAALEE EIAQLEY G (63)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3053.0 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1018.7]^{3+}, [764.3]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1018.7]^{3+}, [764.6]^{4+}$

Ausbeute: 4% (120 nmol)

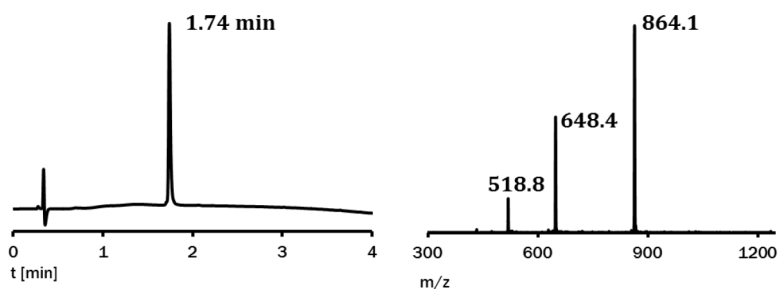
 $\epsilon_{555\text{nm}} = 95,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Das Chromatogramm und zusätzliche Signale im ESI-Spektrum lassen auf kleinere Verunreinigungen durch eine Abbruchsequenz schließen. In Anbetracht der Menge wurde jedoch von einer weiteren Aufreinigung abgesehen.

C-KNAALKE KNQQLKE KIQALKY (64)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

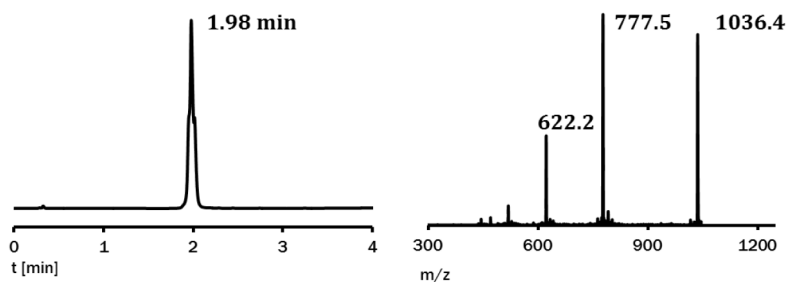
 $M_{\text{calc}} = 2589.07 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [864.0]^{3+}, [648.3]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [864.1]^{3+}, [648.4]^{4+}$ Ausbeute: 24% (2.4 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 27,282 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **TMR-G-MPAA-KNAALKE KNQQLKE KIQALKY G (65)**

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3105.4 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1036.1]^{3+}, [777.4]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1036.4]^{3+}, [777.5]^{4+}$

Ausbeute: 4% (120 nmol)

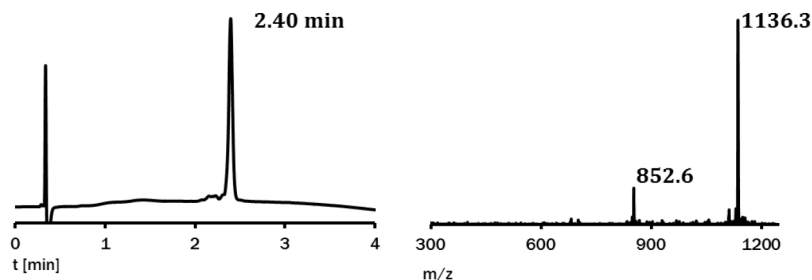
 $\epsilon_{555\text{nm}} = 95,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben. Die Peakform variiert je nach Injektionspuffer und Konzentration. Die Reinheit wurde aus ESI-MS, MALDI-Daten und der Peakform in der HPLC-FL/D hergeleitet.

C-EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G (66)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

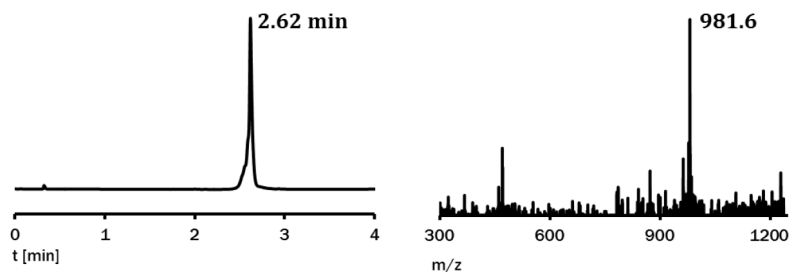
 $M_{\text{calc}} = 3406.60 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1136.5]^{3+}, [852.7]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1136.3]^{3+}, [852.6]^{4+}$ Ausbeute: 11% (1.1 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 35,361 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **TMR-G-MPAA-EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G (67)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3924.1 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [982.0]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [981.6]^{4+}$

Ausbeute: 4% (120 nmol)

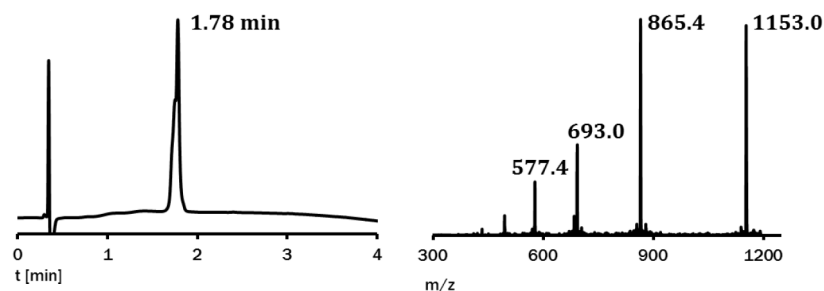
 $\epsilon_{555\text{nm}} = 95,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben. Die Peakform variiert je nach Injektionspuffer und Konzentration. Die Reinheit wurde aus ESI-MS, MALDI-Daten und der Peakform in der HPLC-FL/D hergeleitet.

C-KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY G (68)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3457.10 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1153.4]^{3+}, [865.3]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1153.0]^{3+}, [865.4]^{4+}$ Ausbeute: 38% (3.8 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 35,111 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben. Die Peakform variiert je nach Injektionspuffer und Konzentration. Die Reinheit wurde aus ESI-MS, MALDI-Daten und der Peakform in der HPLC-FL/D hergeleitet.

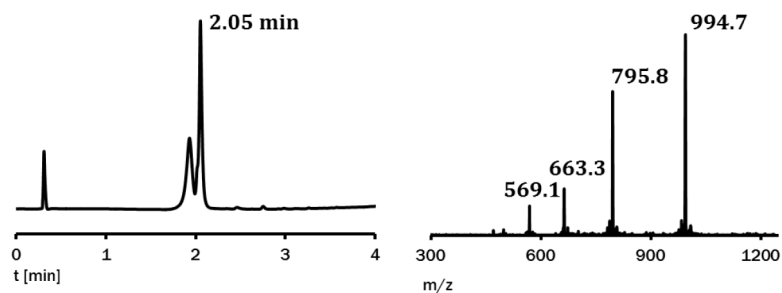
TMR-G-MPAA-KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY G (69)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3974.9 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [994.7]^{4+}, [796.0]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [994.7]^{4+}, [795.8]^{5+}$

Ausbeute: 5% (150 nmol)

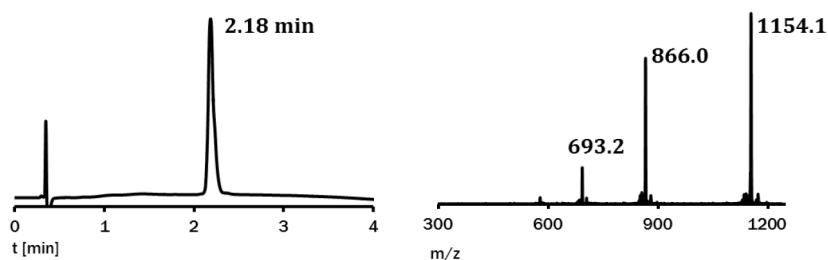
 $\epsilon_{555\text{nm}} = 95,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist einer Überladung der Säule und / oder der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben. Die Reinheit wurde aus ESI-MS, MALDI-Daten und der Peakform in der HPLC-FL/D hergeleitet.

C-EIQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY G (70)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3459.88 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1154.3]^{3+}, [866.0]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1154.1]^{3+}, [866.0]^{4+}$ Ausbeute: 32% (3.2 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 35,353 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben. Die Peakform variiert je nach Injektionspuffer und Konzentration. Die Reinheit wurde aus ESI-MS, MALDI-Daten und der Peakform in der HPLC-FL/D hergeleitet.

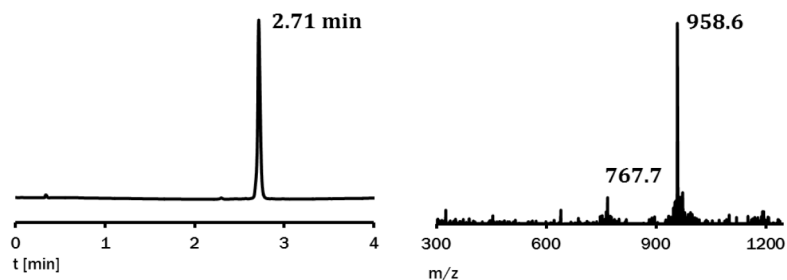
Cou-G-MPAA-EIQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY G (71)

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3829.49 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [958.4]^{4+}, [766.9]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [958.6]^{4+}, [767.7]^{5+}$

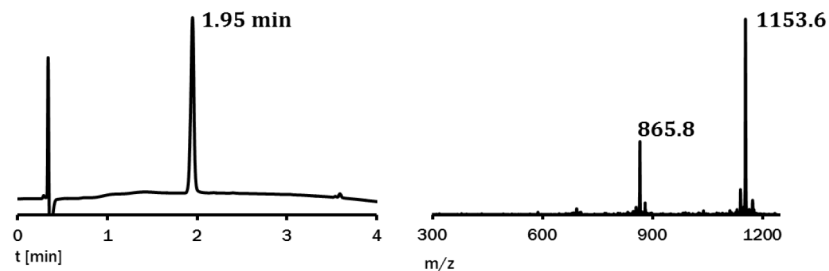
Ausbeute: 6% (180 nmol)

 $\epsilon_{442\text{nm}} = 44,300 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

C-KIAQLKQ KIQALKQ ENQLEE ENAALEY G (72)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

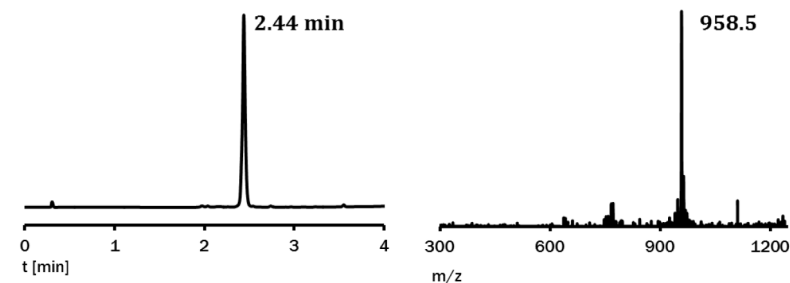
 $M_{\text{calc}} = 3458.89 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1154.0]^{3+}, [865.7]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1153.6]^{3+}, [865.8]^{4+}$ Ausbeute: 11% (1.1 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 35,387 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Cou-G-MPAA-KIAQLKQ KIQALKQ ENQLEE ENAALEY G (73)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3831.4 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [958.9]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [958.5]^{4+}$

Ausbeute: 16% (480 nmol)

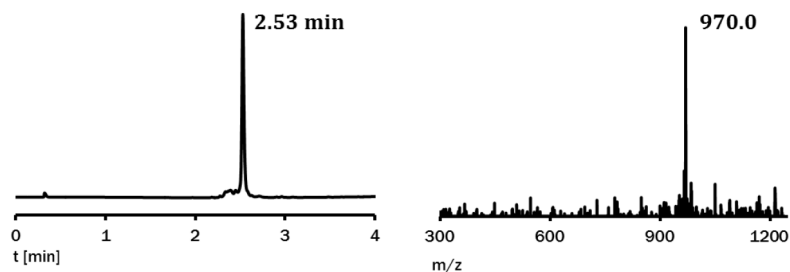
 $\epsilon_{442\text{nm}} = 44,300 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **TMR-G-C-EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G (74)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3876.2 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [970.1]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [970.0]^{4+}$

Ausbeute: 7% (210 nmol)

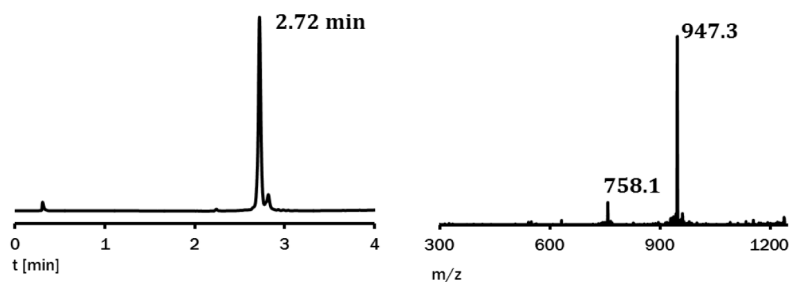
 $\epsilon_{555\text{nm}} = 95,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Cou-G-C-EIQQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY G (75)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3786.5 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [947.6]^{4+}, [758.3]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [947.3]^{4+}, [758.1]^{5+}$

Ausbeute: 27% (810 nmol)

 $\epsilon_{442\text{nm}} = 44,300 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Peptide aus Kapitel 4.5)

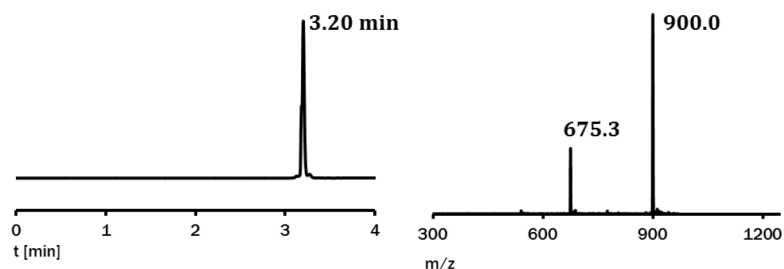
FAM-EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (76)

HPLC-Gradient:

30 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2697 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [900.0]^{3+}, [675.3]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [900.0]^{3+}, [675.3]^{4+}$

Ausbeute: 29% (870 nmol)

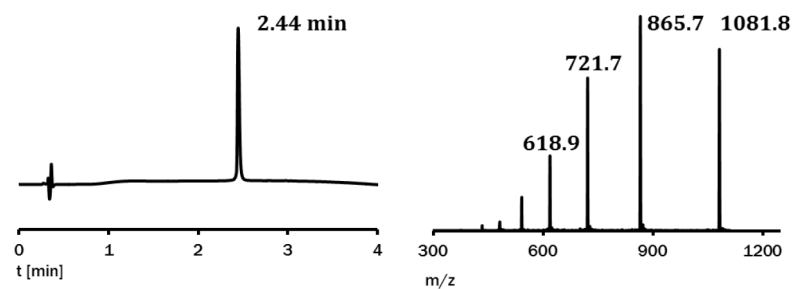
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 20,960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-K(DabcyI)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAQLKE KNAALKE G (77)**

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

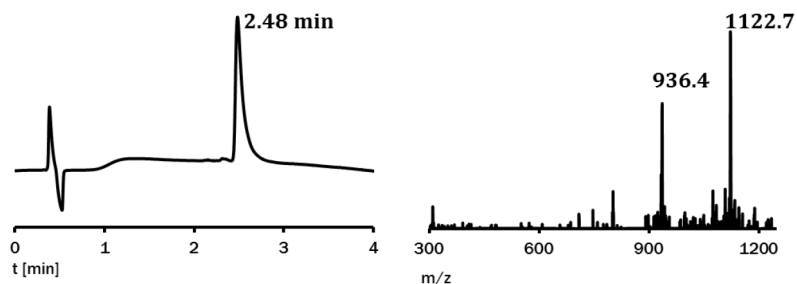
 $M_{\text{calc}} = 4323.22 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1081.8]^{4+}, [865.7]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1081.8]^{4+}, [865.7]^{5+}$

Ausbeute: 9% (460 nmol)

 $\epsilon_{478\text{nm}} = 35,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G (78)**

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 5610.10 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1123.0]^{5+}, [936.0]^{6+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1122.7]^{5+}, [936.4]^{6+}$ Ausbeute: 25% (3.08 μmol) $\epsilon_{214\text{nm}} = 55,572 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Länge und Sequenz des Coiled-Coil-Peptids führt zur Interaktion des Peptids mit der stationären Phase. Als Ergebnis ist Tailing selbst bei geringen Probenkonzentrationen zu beobachten. Die Reinheit wurde aus ESI-MS und MALDI-Daten hergeleitet.

Ac-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQLKY KIAQLKQ KIQALKQ G
(79)

HPLC-Gradient:

15 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 7277.77 \text{ g/mol}$

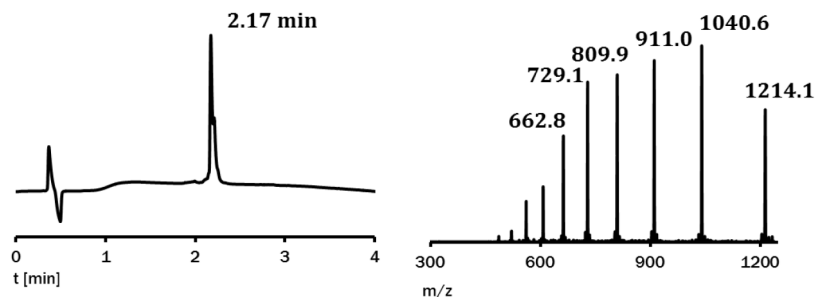
$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1214.0]^{6+}, [1040.7]^{7+}, [910.7]^{8+}, [809.6]^{9+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1214.1]^{6+}, [1040.6]^{7+}, [911.0]^{8+}, [809.9]^{9+}$

Ausbeute: 25% (3.07 μmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 69,109 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist der Bildung von Sekundärstrukturen zuzuschreiben, da die Peakform je nach Konzentration variiert. Die Reinheit wurde aus ESI-MS- und MALDI-Daten abgeleitet.



Ac-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY EIQQLEE EIAQLEQ G
(80)

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 7291.90 \text{ g/mol}$

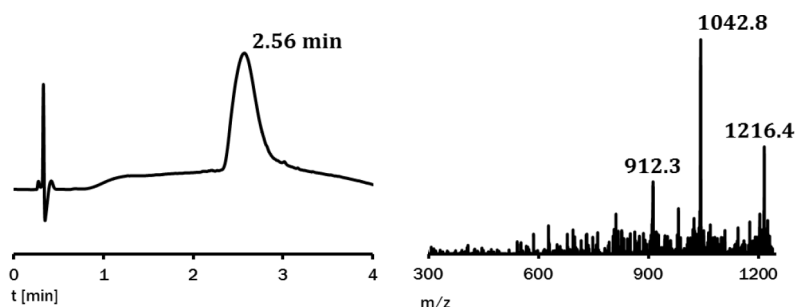
$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1216.3]^{6+}, [1042.7]^{7+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1216.4]^{6+}, [1042.8]^{7+}$

Ausbeute: 30% (3.80 μmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 69,664 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

Die Länge und Sequenz des Coiled-Coil-Peptids führt zur Interaktion des Peptids mit der stationären Phase. Als Ergebnis ist Tailing und eine Peakverbreiterung selbst bei geringen Probenkonzentrationen zu beobachten. Die Reinheit wurde aus ESI-MS und MALDI-Daten hergeleitet.



Ac-K(Dabcyl)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAA G (81)

HPLC-Gradient:

30 – 60% Laufmittel B

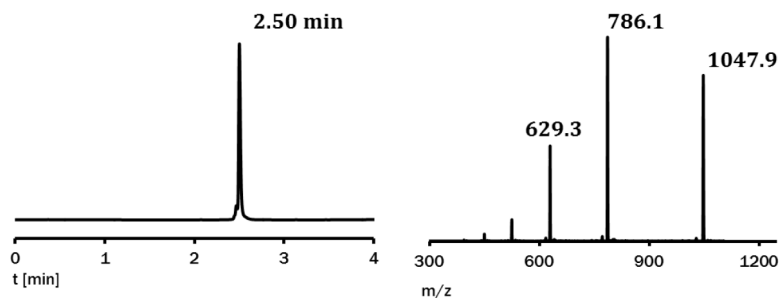
$M_{\text{calc}} = 3140.85 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1048.0]^{3+}, [786.2]^{4+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1047.9]^{3+}, [786.1]^{4+}$

Ausbeute: 9% (278 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 8,683 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



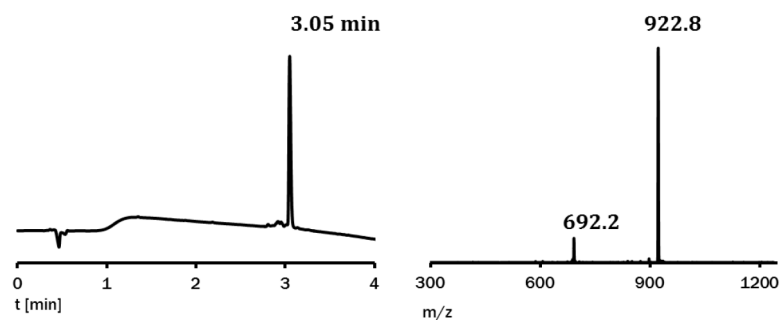
Ac-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAA G (82)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2765.16 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [922.7]^{3+}, [692.3]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [922.8]^{3+}, [692.2]^{4+}$

Ausbeute: 9% (280 nmol)

 $\varepsilon_{214\text{nm}} = 26,182 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

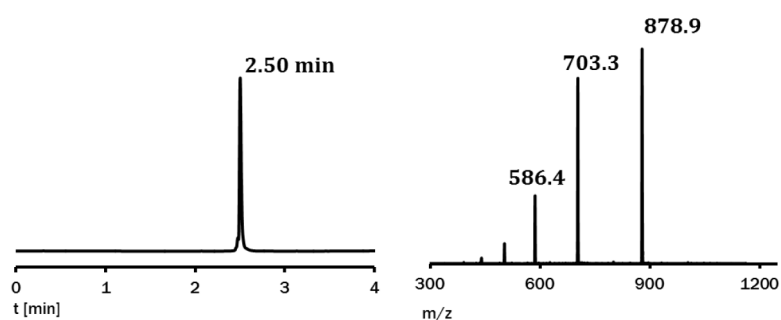
Ac-K(Dabcyl)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAALKE G (83)

HPLC-Gradient:

30 – 50% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3511.29 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [878.8]^{4+}, [703.3]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [878.9]^{4+}, [703.3]^{5+}$

Ausbeute: 21% (635 nmol)

 $\varepsilon_{260\text{nm}} = 8,683 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

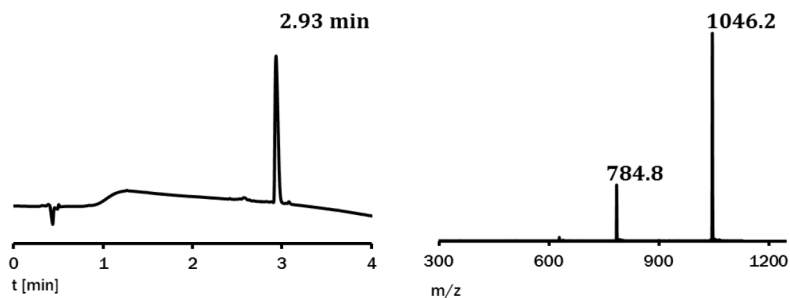
Ac-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (84)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3135.60 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1046.2]^{3+}, [784.9]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1046.2]^{3+}, [784.8]^{4+}$

Ausbeute: 5% (154 nmol)

 $\varepsilon_{214\text{nm}} = 29,115 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

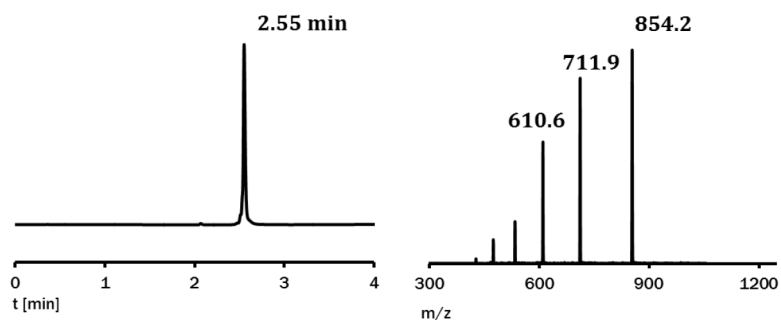
Ac-K(Dabcyl)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAALKE G (85)

HPLC-Gradient:

30 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 4265.22 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [854.1]^{3+}, [711.9]^{4+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [854.2]^{3+}, [711.9]^{4+}$

Ausbeute: 20% (600 nmol)

 $\varepsilon_{260\text{nm}} = 8,683 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Ac-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (86)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

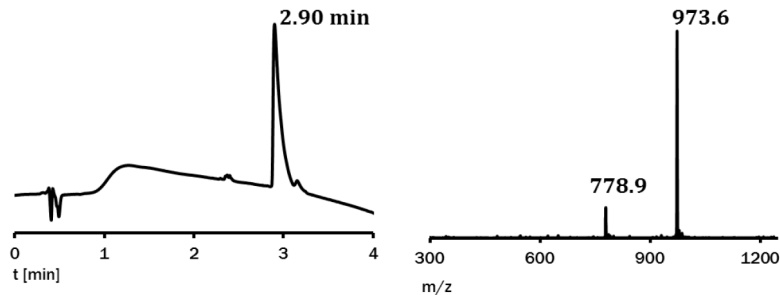
$M_{\text{calc}} = 3890.48 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [973.6]^{4+}, [779.1]^{5+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [973.6]^{4+}, [778.9]^{5+}$

Ausbeute: 13% (234 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 35,927 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Die Länge und Sequenz des Coiled-Coil-Peptids führt zur Interaktion des Peptids mit der stationären Phase. Als Ergebnis ist Tailing selbst bei geringen Probenkonzentrationen zu beobachten. Die Reinheit wurde aus ESI-MS und MALDI-Daten hergeleitet.

FAM-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAA G (87)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

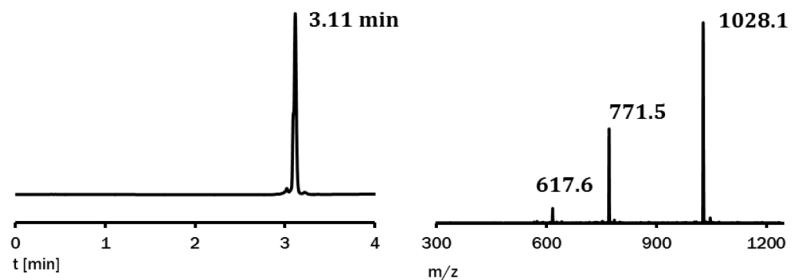
$M_{\text{calc}} = 3081.42 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1028.1]^{3+}, [771.4]^{4+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1028.1]^{3+}, [771.5]^{4+}$

Ausbeute: 14% (408 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 20,960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-K(Dabcyl)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE G (88)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

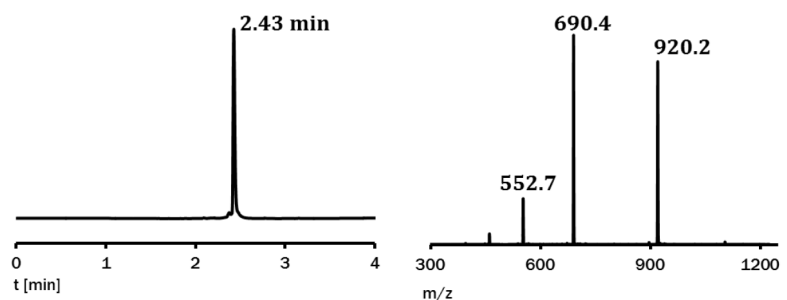
$M_{\text{calc}} = 2757.36 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [920.1]^{3+}, [690.3]^{4+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [920.2]^{3+}, [690.4]^{4+}$

Ausbeute: 19% (580 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 8,683 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



FAM-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (89)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

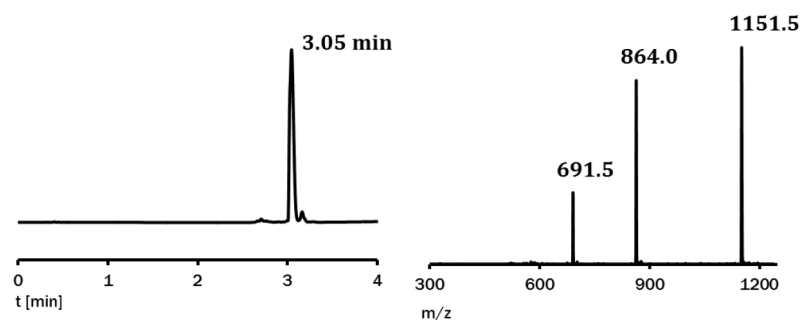
$M_{\text{calc}} = 3451.87 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1151.6]^{3+}, [864.0]^{4+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1151.5]^{3+}, [864.0]^{4+}$

Ausbeute: 12% (360 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 20,960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



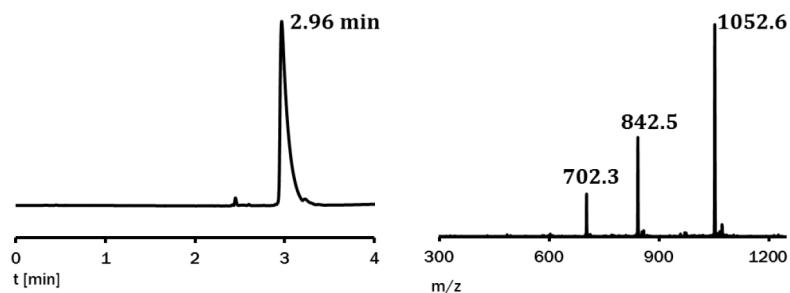
FAM-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (90)

HPLC-Gradient:

30 – 80% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 4206.74 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1052.7]^{4+}, [842.4]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1052.6]^{4+}, [842.5]^{5+}$

Ausbeute: 5% (162 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 20,960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Länge, die Sequenz und die Ergänzung durch FAM führt zur Interaktion des Peptids mit der stationären Phase. Als Ergebnis ist Tailing selbst bei geringen Probenkonzentrationen zu beobachten. Die Reinheit wurde aus ESI-MS und MALDI-Daten hergeleitet.

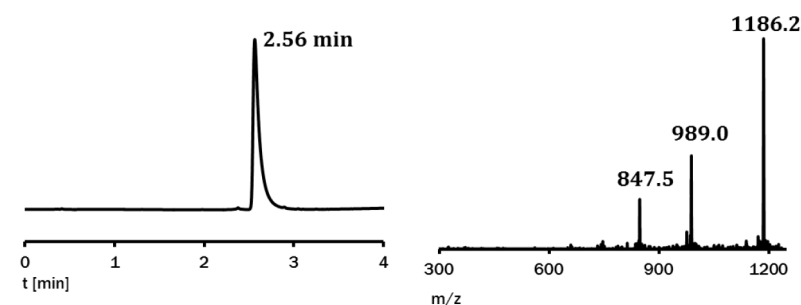
FAM-EIAALEK EIAALEK EIAALEK EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G (91)

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 5926.37 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1186.3]^{5+}, [988.7]^{6+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1186.2]^{5+}, [989.0]^{6+}$

Ausbeute: 6% (192 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 21,444 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Länge, die Sequenz und die Ergänzung durch FAM führt zur Interaktion des Peptids mit der stationären Phase. Als Ergebnis ist Tailing selbst bei geringen Probenkonzentrationen zu beobachten. Die Reinheit wurde aus ESI-MS und MALDI-Daten hergeleitet.

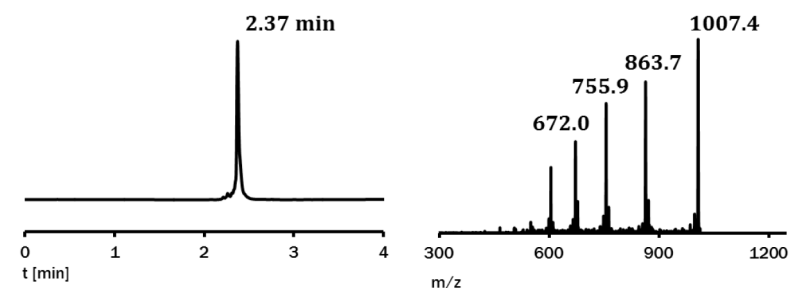
Ac-K(Dabcyl)-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY G (92)

HPLC-Gradient:

35 – 55% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 6037.24 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1007.2]^{6+}, [863.5]^{7+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1007.4]^{6+}, [863.7]^{7+}$

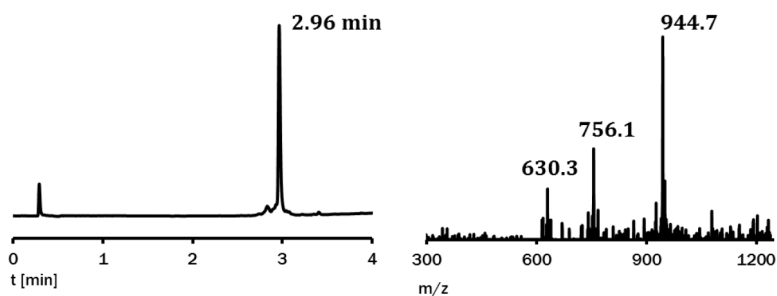
Ausbeute: 22% (660 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 8,683 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Ac-KpYETLG-deg-deg-deg-W-EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (93)

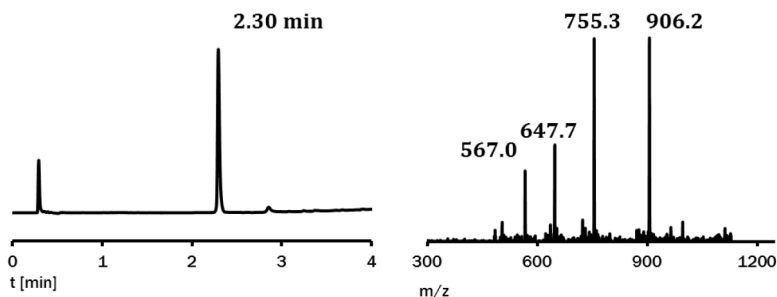
HPLC-Gradient:

25 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3774.17 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [944.6]^{4+}, [755.8]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [944.7]^{4+}, [756.1]^{5+}$ Ausbeute: 20% (1.54 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 4,157 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-KpYETLG-deg-deg-deg-W-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAALKE G (94)**

HPLC-Gradient:

20 – 65% Laufmittel B

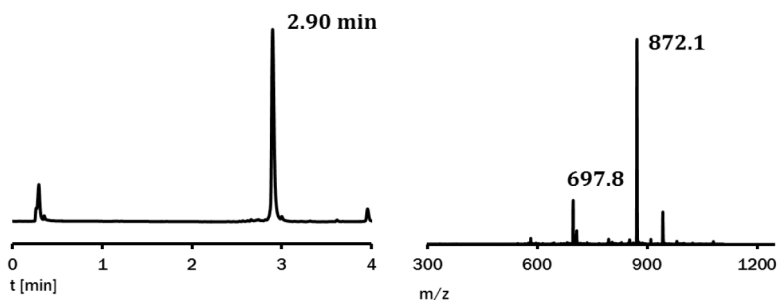
 $M_{\text{calc}} = 4525.28 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [906.1]^{5+}, [755.2]^{6+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [906.2]^{5+}, [755.3]^{6+}$ Ausbeute: 17% (1.10 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 4,157 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-KpYETLG-deg-W-EIAALEK EIAALEK EIAALEK G (95)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

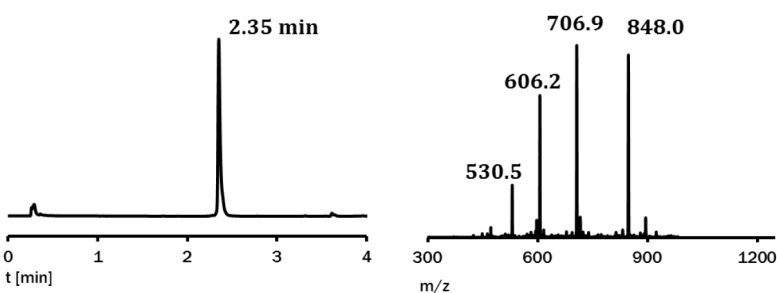
 $M_{\text{calc}} = 3483.85 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [872.0]^{4+}, [697.8]^{5+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [872.1]^{4+}, [697.8]^{5+}$

Ausbeute: 15% (800 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 4,157 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-KpYETLG-deg-W-KIAALKE KIAALKE KIAALKE KIAALKE G (96)**

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 4234.95 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [848.0]^{5+}, [706.8]^{6+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [848.0]^{5+}, [706.9]^{6+}$ Ausbeute: 38% (1.50 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 4,157 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

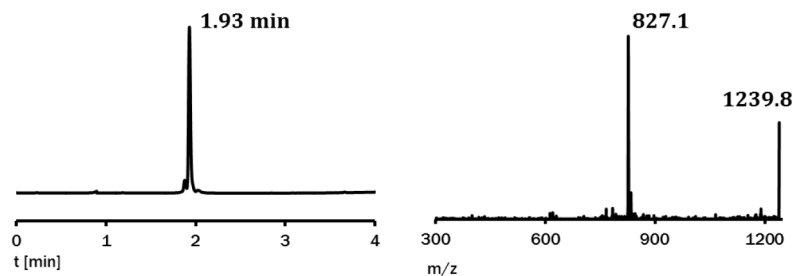
FAM-KpYTGLNTRSQETpYETLG (97)

HPLC-Gradient:

10 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 2478.37 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1240.2]^{2+}, [827.1]^{3+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1239.8]^{2+}, [827.1]^{3+}$

Ausbeute: 5% (225 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 15,693 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ *Peptide und Proteine aus Kapitel 4.7)*

Die für Kapitel 4.7 hergestellten Proteine wurden in geringem Maßstab hergestellt und sollten lediglich die Zugänglichkeit der Verbindungen durch chemische Synthese sicherstellen. Die Cysteinylopeptide **110** und **111** wurden nach Konjugation mit PNA nochmals gereinigt. Von einer Optimierung und zufriedenstellenden Aufreinigung der Proteine, insbesondere **124** und **125**, wurde im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

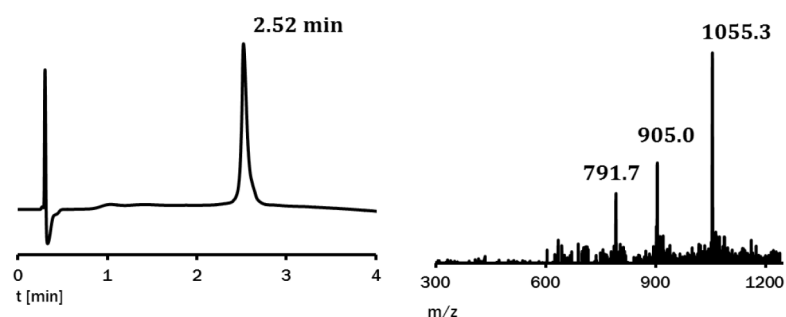
C NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVG YIGE RCQYRDLKWW ELR (110)

HPLC-Gradient:

35 – 80% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 6324.12 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1055.0]^{6+}, [904.4]^{7+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1055.3]^{6+}, [905.0]^{7+}$

Ausbeute: 8% (768 nmol)

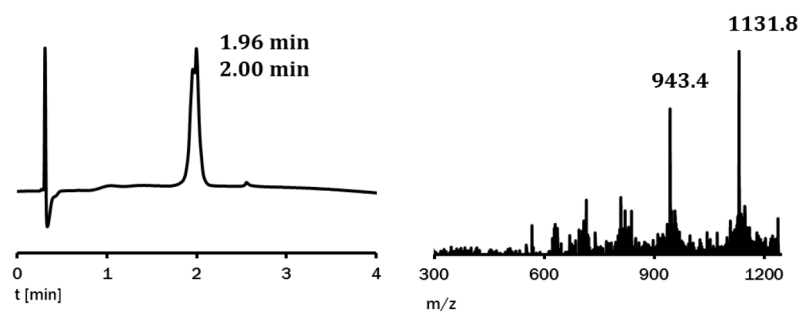
 $\epsilon_{280\text{nm}} = 18,450 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **C VVSHFNDCPD SHTQFCFHGT CRFLVQEDKP ACVCHSGYVG ARCEHADLLA (111)**

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 5654.34 \text{ g/mol}$ $\text{ESI}_{\text{ges}} = [1131.9]^{5+}, [943.4]^{6+}$ $\text{ESI}_{\text{gef}} = [1131.8]^{5+}, [943.4]^{6+}$

Ausbeute: 9% (555 nmol)

 $\epsilon_{214\text{nm}} = 107,576 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVGYIGE RCQYRDLKWW ELR (124)

HPLC-Gradient:

35 – 80% Laufmittel B

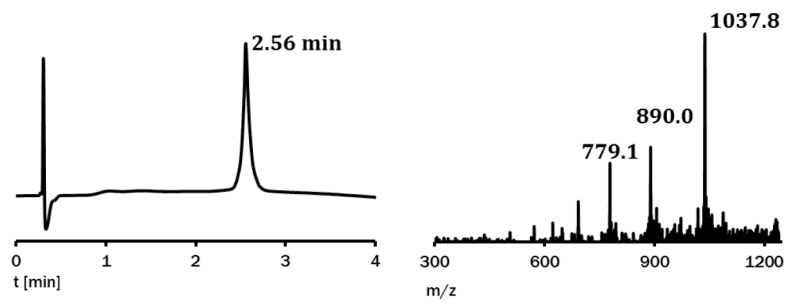
$M_{\text{calc}} = 6220.98 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1037.8]^{6+}, [889.7]^{7+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1037.8]^{6+}, [890.0]^{7+}$

Ausbeute: 12% (689 nmol)

$\epsilon_{280\text{nm}} = 18,450 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



VVSHFNDCPD SHTQFCFHGT CRFLVQEDKP ACVCHSGYVG ARCEHADLLA (125)

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

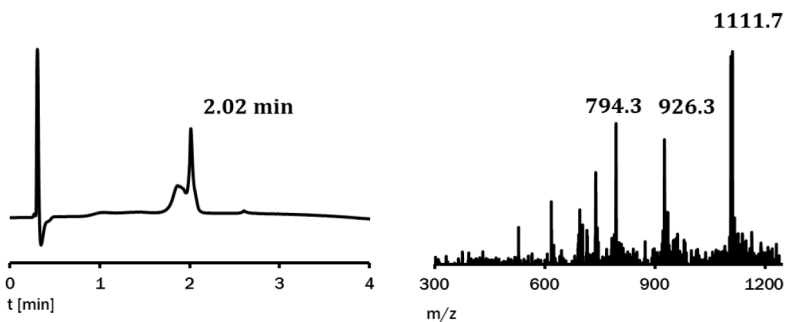
$M_{\text{calc}} = 5551.2 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [1111.3]^{5+}, [926.2]^{6+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [1111.7]^{5+}, [926.3]^{6+}$

Ausbeute: 8% (249 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 106,428 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Peptide aus Kapitel 4.8)

C HNTWFHTLASLH (C-BP_{R8})

HPLC-Gradient:

20 – 80% Laufmittel B

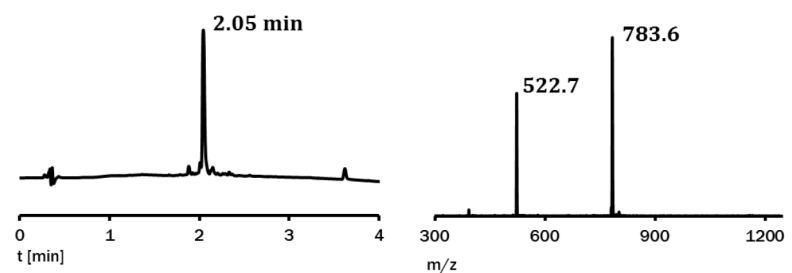
$M_{\text{calc}} = 1565.76 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [783.9]^{2+}, [522.9]^{3+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [783.6]^{2+}, [522.7]^{3+}$

Ausbeute: 63% (3.65 μmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 62,223 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Das Signal zwischen 3 – 4 min resultiert aus einer Verunreinigung der Säule.

C FGPIRHAPTAPV (C-BP_{KLAL})

HPLC-Gradient:

20 – 80% Laufmittel B

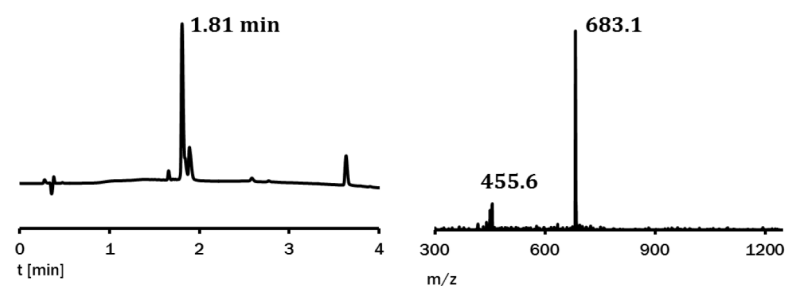
$M_{\text{calc}} = 1364.62 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [683.3]^{2+}, [455.9]^{3+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [683.1]^{2+}, [455.6]^{3+}$

Ausbeute: 67% (3.95 μmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 30,890 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Das Signal zwischen 3 – 4 min resultiert aus einer Verunreinigung der Säule.

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

C GGG HNTWFHTLASLH (C-GGG-BP_{R8})

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

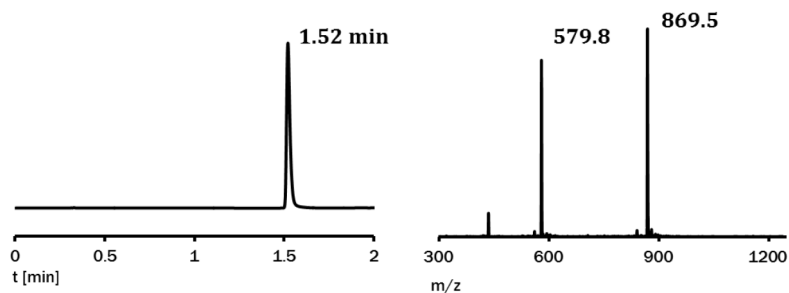
$M_{\text{calc}} = 1736.91 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [869.5]^{2+}, [580.0]^{3+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [869.5]^{2+}, [579.8]^{3+}$

Ausbeute: 8% (368 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 65,055 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



C GGG FGPIRHAPTAPV (C-GGG-BP_{KLAL})

HPLC-Gradient:

10 – 70% Laufmittel B

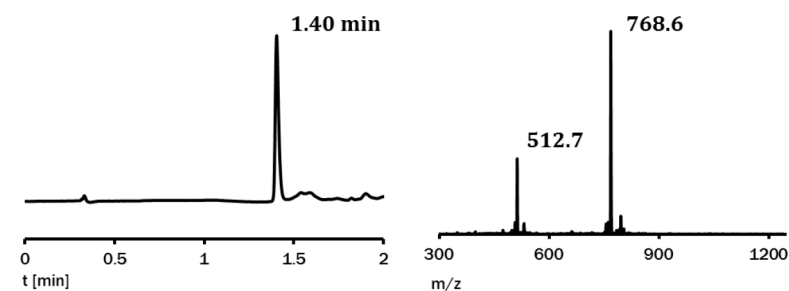
$M_{\text{calc}} = 1535.77 \text{ g/mol}$

$\text{ESI}_{\text{ges}} = [768.9]^{2+}, [512.9]^{3+}$

$\text{ESI}_{\text{gef}} = [768.6]^{2+}, [512.7]^{3+}$

Ausbeute: 17% (300 nmol)

$\epsilon_{214\text{nm}} = 33,722 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



7.2.2.2) PNA-Oligomere

PNA-Oligomere aus Kapitel 4.1)

Alkin(**12**)-ttt-Gly

HPLC-Gradient:

03 – 80% Laufmittel B

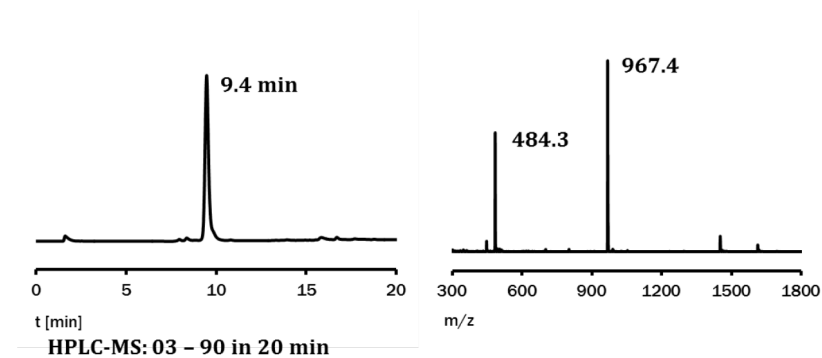
$M_{\text{calc}} = 966.95 \text{ g/mol}$

$\text{ESI-MS}_{\text{ges}} = [968.0]^{1+}, [484.5]^{2+}$

$\text{ESI-MS}_{\text{gef}} = [967.4]^{1+}, [484.3]^{2+}$

Ausbeute: 75% (0,45 μmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Alkin(**12**)-tcg acg-Gly

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

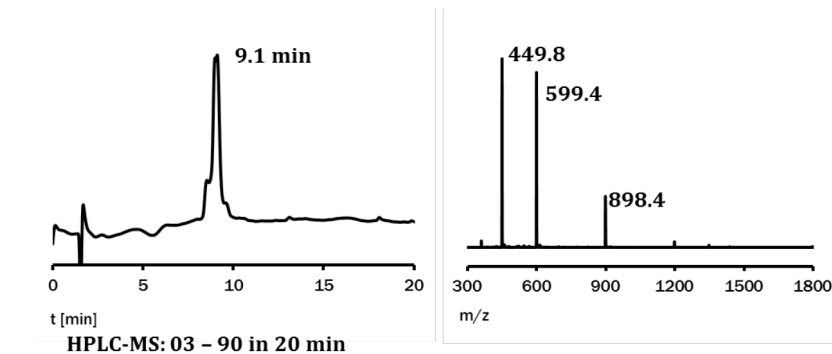
$M_{\text{calc}} = 1794.92 \text{ g/mol}$

$\text{ESI-MS}_{\text{ges}} = [898.4]^{2+}, [599.2]^{3+}$

$\text{ESI-MS}_{\text{gef}} = [898.4]^{2+}, [599.4]^{3+}$

Ausbeute: 87% (4.22 μmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Alkin(**11**)-tcg acg-Gly

HPLC-Gradient:

03 – 80% Laufmittel B

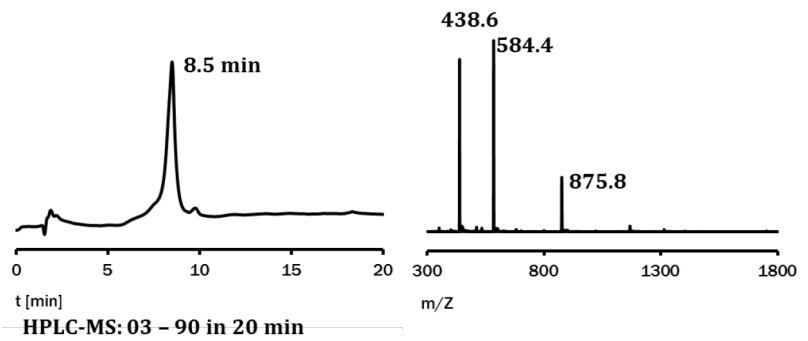
$M_{\text{calc}} =$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [898.4]^{2+}, [599.2]^{3+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [898.4]^{2+}, [599.4]^{3+}$

Ausbeute: 70% (3.3 μmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



ALO-ttt-Gly

HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

03 – 80 % B in 30 min

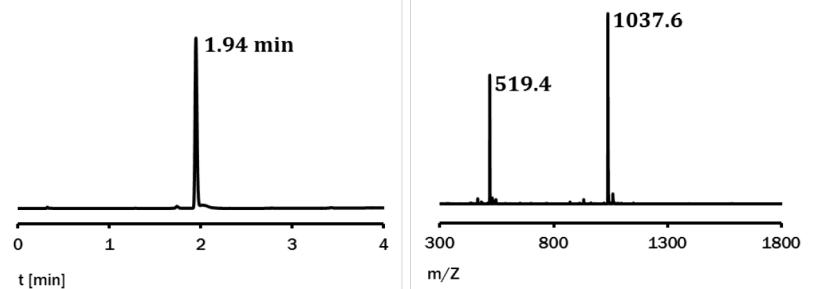
$M_{\text{calc}} = 1037.04 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [1038.0]^{1+}, [519.5]^{2+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [898.4]^{1+}, [519.4]^{2+}$

Ausbeute: 80% (800 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



ALO- tcg acg-Gly

HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

03 – 80 % B in 30 min

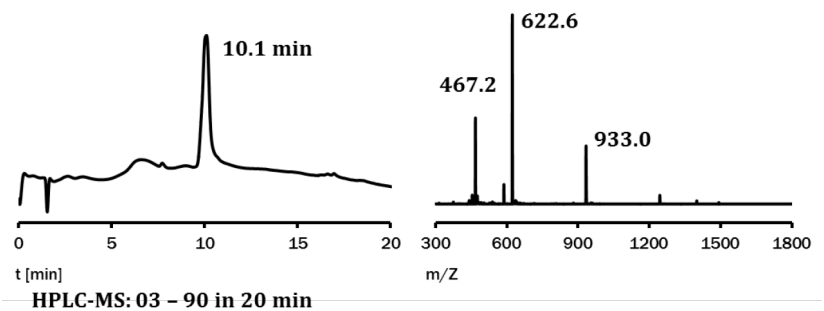
$M_{\text{calc}} = 1864.82 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [933.4]^{2+}, [622.6]^{3+}$,

ESI- $MS_{\text{gef}} = [933.0]^{2+}, [622.6]^{3+}$,

Ausbeute: 23% (264 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



ALO- tgt att cgt cc-Gly

HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

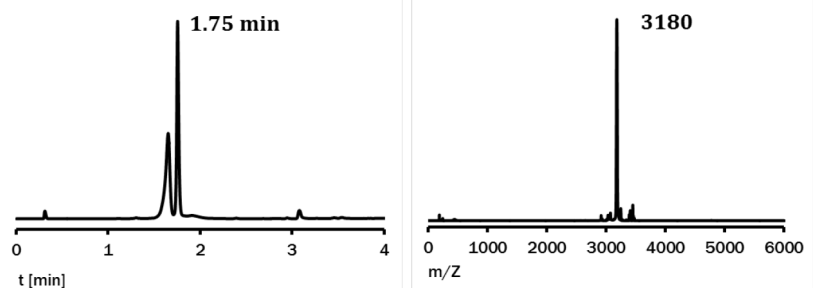
03 – 80 % B in 30 min

$M_{\text{calc}} = 3181.08 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF $_{\text{gef}} = 3180^{[M+H]^+}$

Ausbeute: 36% (360 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



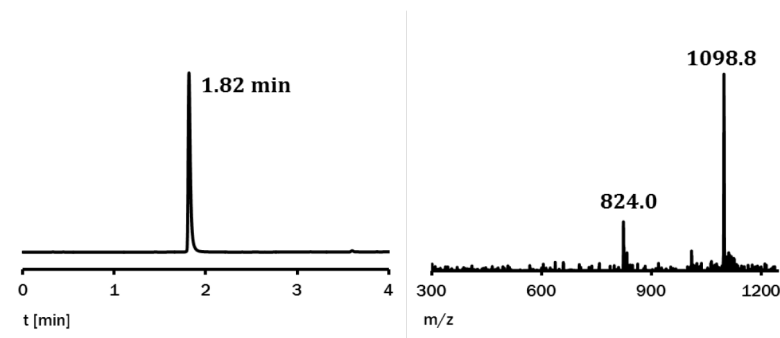
Die Peakform der Verbindung im Chromatogramm ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben.

Ac-tgt att cgt cc-Lys(ALO) (32)

HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

03 – 80 % B in 30 min

 $M_{\text{calc}} = 3294.23 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [1099.1]³⁺, [824.6]⁴⁺ESI-MS_{gef} = [1098.9]³⁺, [824.0]⁴⁺Ausbeute: 40% (2 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-gcc ttt gta ttc gtc c-Lys(ALO) (33)**

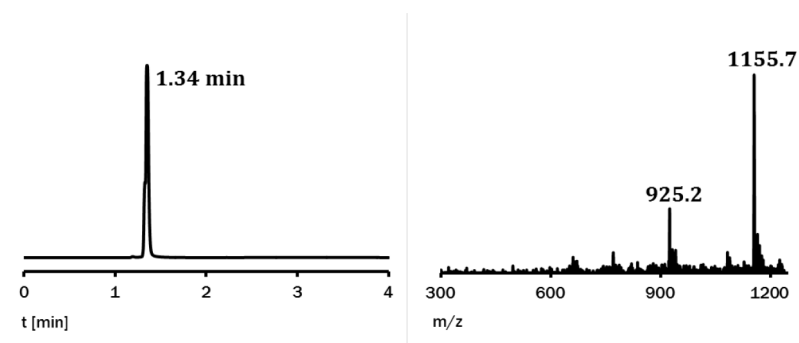
HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

03 – 80 % B in 30 min

 $M_{\text{calc}} = 4620.50 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [1156.1]⁴⁺, [925.1]⁵⁺ESI-MS_{gef} = [1155.7]⁴⁺, [925.2]⁵⁺

Ausbeute: 13% (480 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 141,900 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **PNA-Oligomere aus Kapitel 4.2)****ALO-Lys(TMR)-ttt-Gly (40)**

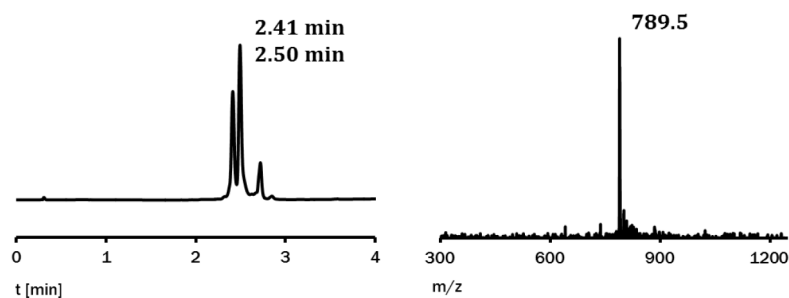
HPLC-Gradient:

10 min 0% Laufmittel B,

03 – 80 % B in 30 min

 $M_{\text{calc}} = 1577.65 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [789.8]²⁺ESI-MS_{gef} = [789.5]²⁺

Ausbeute: 12% (120 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 57,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Verbindung, der der dritte Peak zugeschrieben werden kann, konnte nicht über HPLC abgetrennt werden. Eine vollständige Reinigung erfolgte nach dem Folgeschritt in Verbindung **41**.

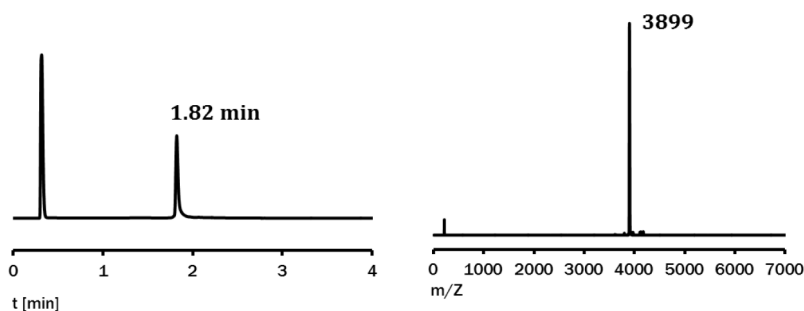
TMR-a gga cga ata ca-Gly (42)

HPLC-Gradient:

10 – 80 % Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3892.8 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 3899^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 10% (250 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 170,500 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse.

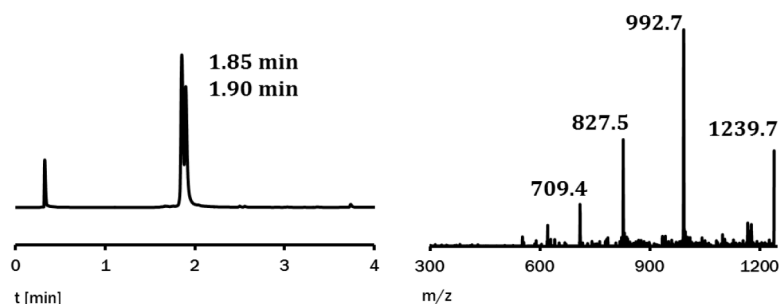
TMR-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂(CO)-c gag caa ggc cct gag-Gly (50)

HPLC-Gradient:

03 – 55% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 4958.75 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [993.0]⁵⁺, [827.6]⁶⁺ESI-MS_{gef} = [992.7]⁵⁺, [827.5]⁶⁺

Ausbeute: 6% (170 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 198,200 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse. Der Doppelpeak ist den beiden TMR-Isomeren zuzuschreiben.

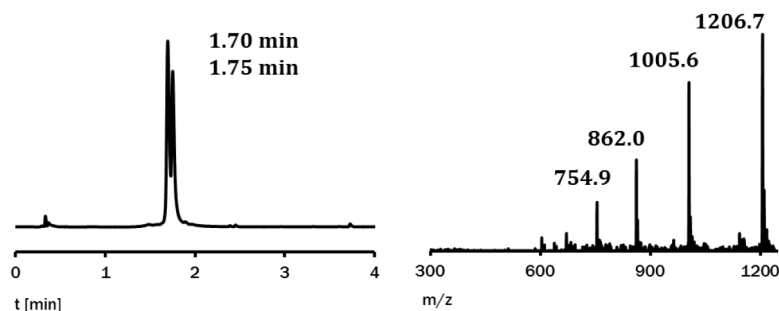
TMR-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂(CO)-gc cac gag caa ggc cct gag-Gly (53)

HPLC-Gradient:

03 – 55% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 6027.77 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [1206.6]⁵⁺, [1005.6]⁶⁺ESI-MS_{gef} = [1206.7]⁵⁺, [1005.6]⁶⁺

Ausbeute: 14% (420 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 236,700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

PNA-Oligomere aus Kapitel 4.6)

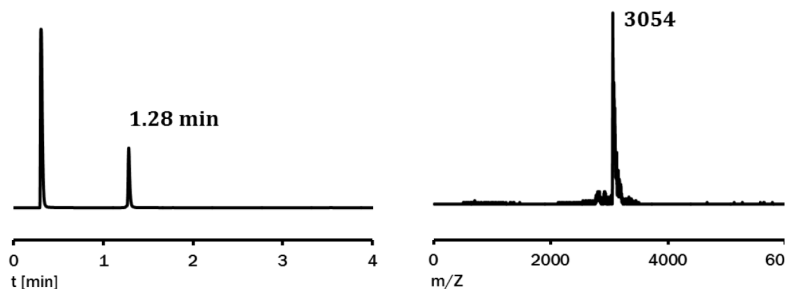
Ac-tgt att cgt cc-Gly (**98**)

HPLC-Gradient:

00 – 50% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 3058.91 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 3054^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 43% (760 nmol)

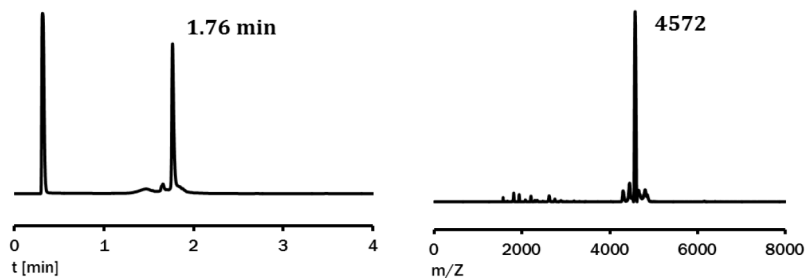
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse.

Ac-gag atg tat tcg tcc Lys(**Dabcyl**)-Gly (**100**)

HPLC-Gradient:

03 – 60% Laufmittel B

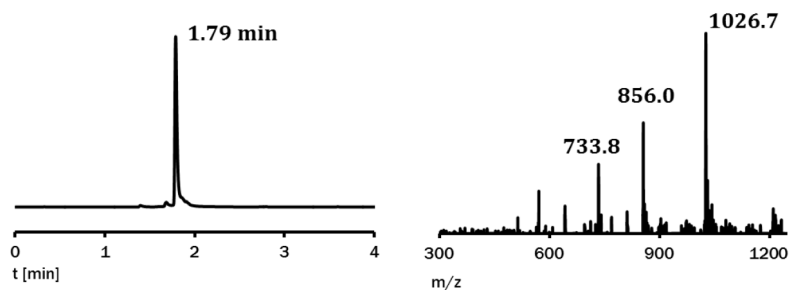
 $M_{\text{calc}} = 4571.43 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 4572^{[M+H]⁺}Ausbeute: 32% (1.55 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 150,473 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse.

Ac- ga gat gtg tat tcg tcc Lys(**Dabcyl**)-Gly (**102**)

HPLC-Gradient:

03 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 5128.95 \text{ g/mol}$ ESI-MS_{ges} = [1026.8]⁵⁺, [855.8]⁶⁺ESI-MS_{gef} = [1026.7]⁵⁺, [856.0]⁶⁺Ausbeute: 52% (1.05 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 170,700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Ac- g aga tgg atg tat tcg tcc Lys(**Dabcyl**)-Gly (**104**)

HPLC-Gradient:

03 – 60% Laufmittel B

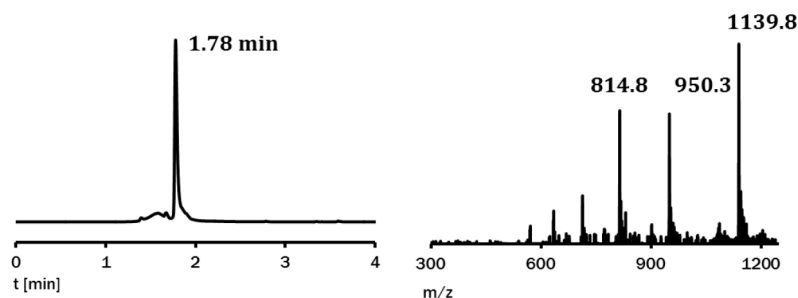
$M_{\text{calc}} = 5695.48 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [1140.1]^{5+}, [950.3]^{6+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [1139.8]^{5+}, [950.3]^{6+}$

Ausbeute: 39% (730 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 196,000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-g cct ttg tat tcg tcc-Gly (**105**)

HPLC-Gradient:

00 – 50% Laufmittel B

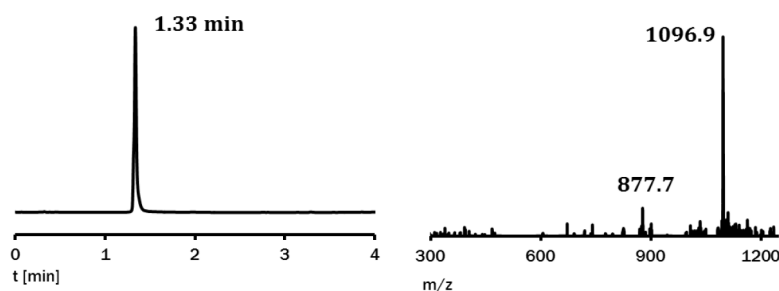
$M_{\text{calc}} = 4385.17 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [1097.3]^{4+}, [878.0]^{5+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [1096.9]^{4+}, [877.7]^{5+}$

Ausbeute: 26% (720 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 141,900 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-gc gc ctg cct ttg tat tcg tcc Lys(**Dabcyl**)-Gly (**107**)

HPLC-Gradient:

00 – 50% Laufmittel B

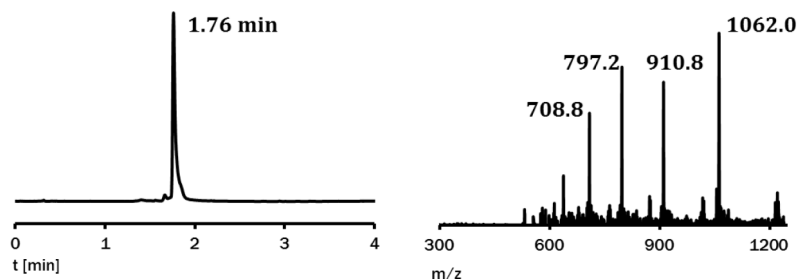
$M_{\text{calc}} = 6367.13 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [1062.2]^{6+}, [910.6]^{7+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [1062.0]^{6+}, [910.8]^{7+}$

Ausbeute: 37% (990 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 204,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-gc gc ctg cct ttg tat tcg tcc-Gly (**108**)

HPLC-Gradient:

00 – 50% Laufmittel B

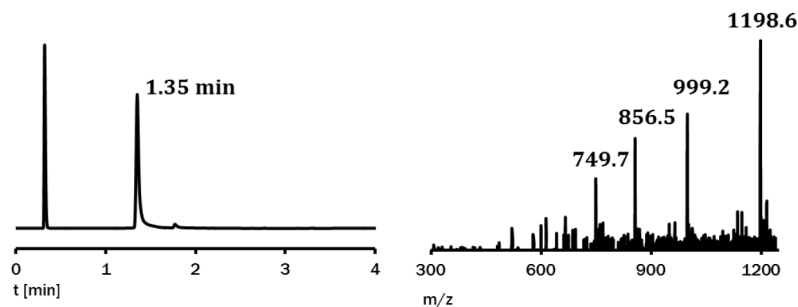
$M_{\text{calc}} = 5987.68 \text{ g/mol}$

ESI- $MS_{\text{ges}} = [1198.5]^{5+}, [999.0]^{6+}$

ESI- $MS_{\text{gef}} = [1198.6]^{5+}, [999.2]^{6+}$

Ausbeute: 25% (700 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 193,700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

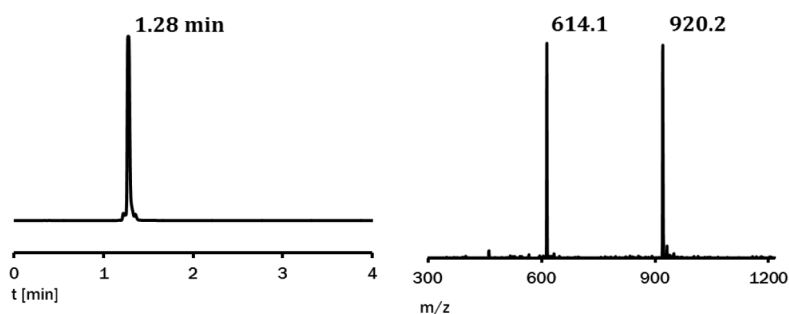


Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse.

*PNA-Oligomere aus Kapitel 4.7)***Ac-tcg tcc-Gly-MPA-Gly (112)**

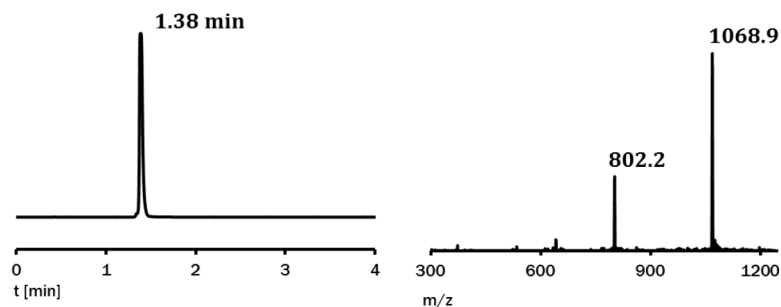
HPLC-Gradient:

03 – 60% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 1838.80 \text{ g/mol}$ ESI- $MS_{\text{ges}} = [920.4]^{2+}, [613.9]^{3+}$ ESI- $MS_{\text{gef}} = [920.2]^{2+}, [614.1]^{3+}$ Ausbeute: 80% (6.70 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 48,700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-tgt att cgt cc-Gly-MPA-Gly (113)**

HPLC-Gradient:

03 – 60% Laufmittel B

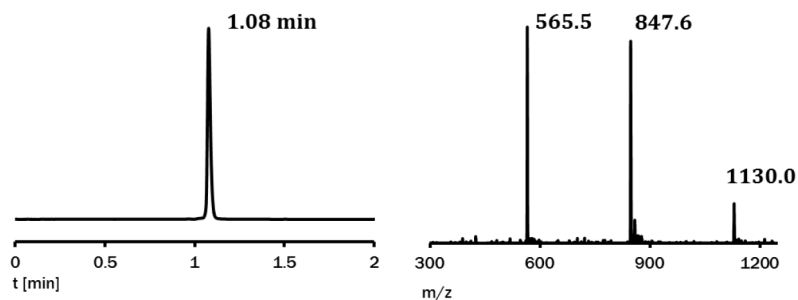
 $M_{\text{calc}} = 3204.09 \text{ g/mol}$ ESI- $MS_{\text{ges}} = [1069.0]^{3+}, [820.0]^{4+}$ ESI- $MS_{\text{gef}} = [1068.9]^{3+}, [820.2]^{4+}$ Ausbeute: 21% (1.50 μmol) $\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-tcg tcc-Gly (118)**

HPLC-Gradient:

00 – 50% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 1693.61 \text{ g/mol}$ ESI- $MS_{\text{ges}} = [847.8]^{2+}, [565.5]^{3+}$ ESI- $MS_{\text{gef}} = [847.6]^{2+}, [565.5]^{3+}$ $[1130.0] = [2 \times \mathbf{118}]^{3+}$

Ausbeute: 34% (480 nmol)

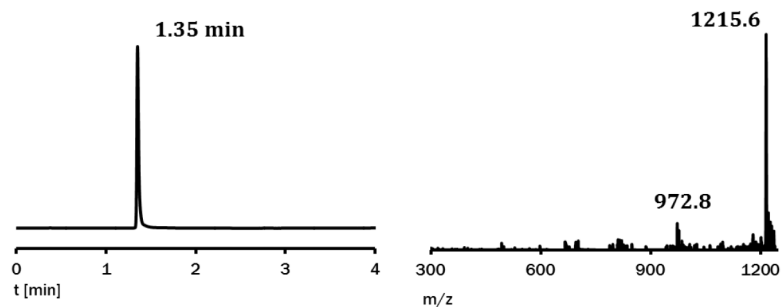
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 48,700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ **Ac-gcc ttt gta ttc gtc c-GlySerLysGlyGly-MPA-Gly (126)**

HPLC-Gradient:

00 – 30% Laufmittel B

 $M_{\text{calc}} = 4859.70 \text{ g/mol}$ ESI- $MS_{\text{ges}} = [1215.9]^{4+}, [972.9]^{5+}$ ESI- $MS_{\text{gef}} = [1215.6]^{4+}, [972.8]^{5+}$

Ausbeute: 15% (760 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 141,900 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 

7.2.2.3) Peptid-PNA-Konjugate

*Peptid-PNA-Konjugate aus Kapitel 4.1)*Gly-^Cttt^N-Alkin(**12**)N₃-**Linker5**-(KIAALKE)₃G (**14**)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

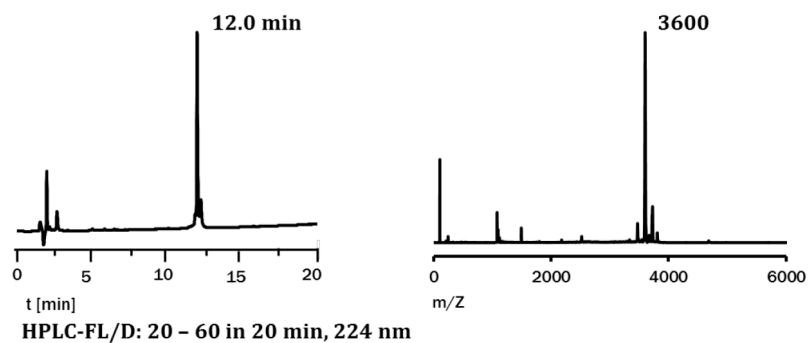
 $M_{\text{calc}} = 3600.11 \text{ g/mol}$ MALDI-TOF_{gef} = 3600^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 1.2% (41 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(bezogen auf K3-Peptid

beladenes Harz)

Gly-^Cgca gct^N-Alkin(**12**)N₃-**Linker5**-(KIAALKE)₃G (**15**)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

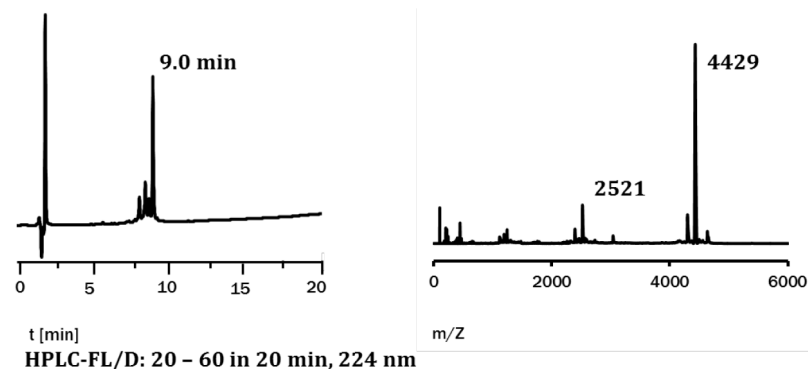
 $M_{\text{calc}}(\text{Produkt}) = 4427.88 \text{ g/mol}$ $M_{\text{calc}}(\text{Hydrolyse}) = 2520.0 \text{ g/mol}^*$ MALDI-TOF_{gef} = 4429^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 0.3% (34 nmol)

 $\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(bezogen auf K3-Peptid

beladenes Harz)

Gly-^Cgca gct^N-Alkin(**11**)N₃-**Linker5**-(KIAALKE)₃G (**16**)

HPLC-Gradient:

20 – 60% Laufmittel B

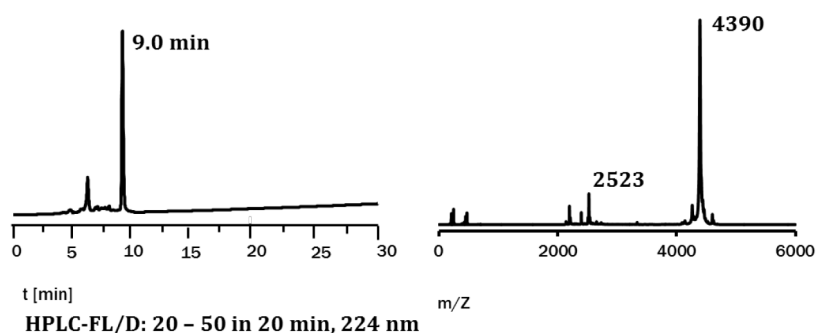
 $M_{\text{calc}} = 4385.80 \text{ g/mol}$ $M_{\text{calc}}(\text{Hydrolyse}) = 2520.0 \text{ g/mol}^*$ MALDI-TOF_{gef} = 4390^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 0.2% (0.4 nmol)

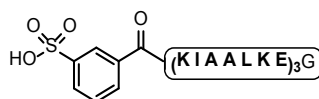
 $\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

(bezogen auf K3-Peptid

beladenes Harz)



* K3-Peptid nach Linkerhydrolyse

 $M_{\text{calc}}(\text{Hydrolyse}) = 2520.0 \text{ g/mol}$ 

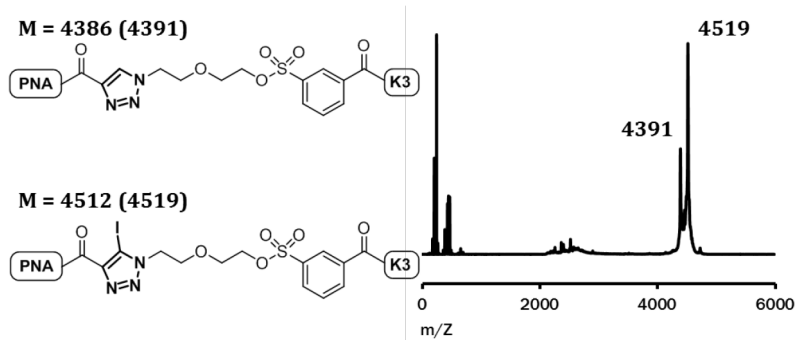
7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

MALDI-Untersuchung einer Mischfraktion von Produkt **16** und dem Nebenprodukt als Iodtriazol

Produkt

$M_{\text{calc}} = 4385.80 \text{ g/mol}$

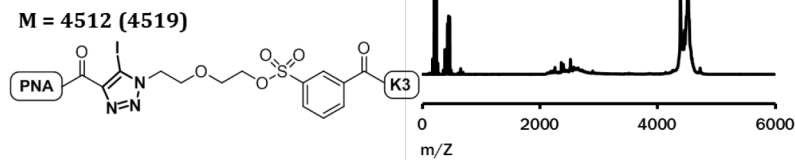
$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 4391^{[M+H]^+}$



Iodtriazol

$M_{\text{calc}} = 4511.70 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 4519^{[M+H]^+}$



Gly-Cttt^N-ALON₃-Linker5-(KIAALKE)₃G (**17**)

HPLC-Gradient:

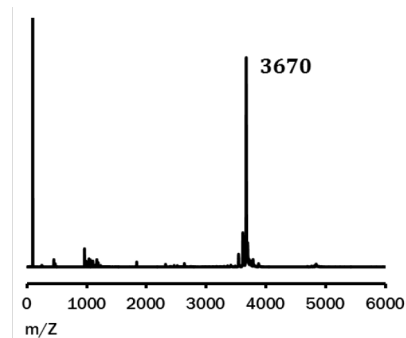
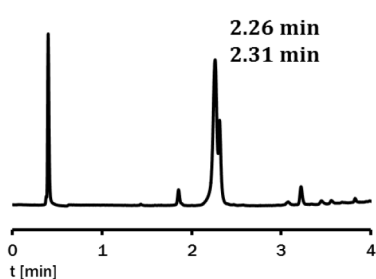
10 – 60% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 3670.20 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 3670^{[M+H]^+}$

Ausbeute: 51% (82 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L/(mol}\cdot\text{cm)}$



Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse. Der Doppelpeak resultiert aus den Regioisomeren durch SPAAC.

Gly-Cgca gct^N-ALON₃-Linker5-(KIAALKE)₃G (**18**)

HPLC-Gradient:

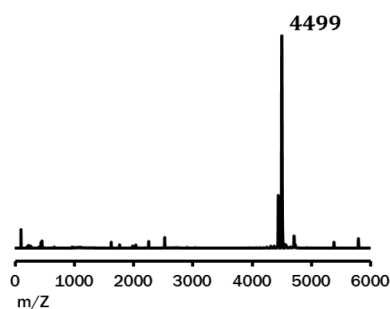
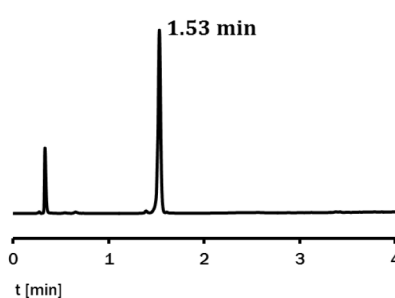
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 4497.98 \text{ g/mol}$

$\text{MALDI-TOF}_{\text{gef}} = 4499^{[M+H]^+}$

Ausbeute: 18% (14 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 58,800 \text{ L/(mol}\cdot\text{cm)}$



Die Absorption im Injektionspeak ist einer Überladung der Säule zuzuschreiben. Das ESI-Spektrum im Injektionspeak entspricht der Produktmasse. Die Regioisomere durch SPAAC wurden in diesem Fall getrennt.

7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Gly-^Cttt^N-**ALON**₃-**Linker5**-Ahx-(KIAALKE)₃G (**19**)

HPLC-Gradient:

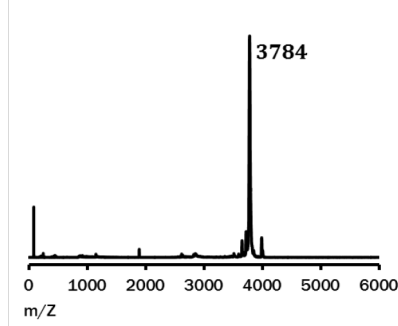
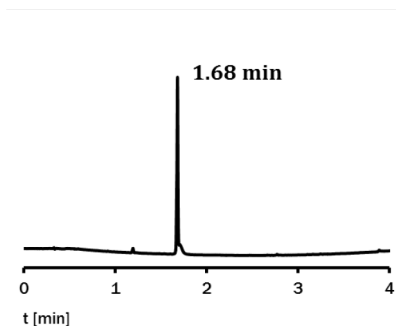
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 3783.36 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 3784^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 21% (17 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Gly-^Cttt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPA-(KIAALKE)₃G (**25**)

HPLC-Gradient:

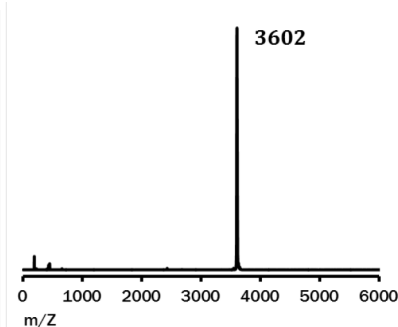
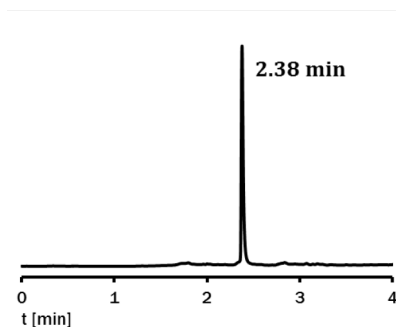
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 3600.19 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 3602^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 14% (7 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Gly-^Ccc tgc tta tgt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPA-(KIAALKE)₃G (**26**)

HPLC-Gradient:

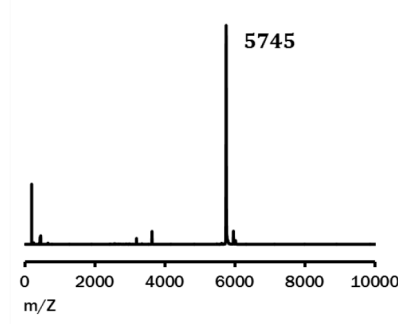
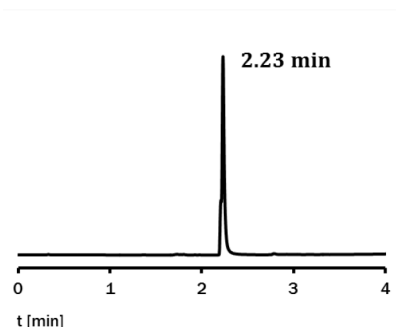
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 5744.23 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 5745^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 12% (2.4 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Gly-^Cttt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-(KIAALKE)₃G (**27**)

HPLC-Gradient:

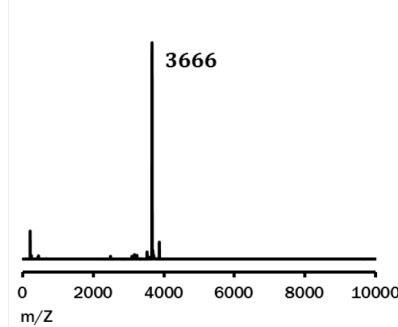
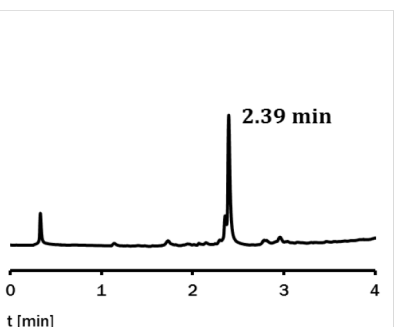
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 3662.27 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 3666^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 53% (16 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Gly-^Ccc tgc tta tgt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-(KIAALKE)₃G (**28**)

HPLC-Gradient:

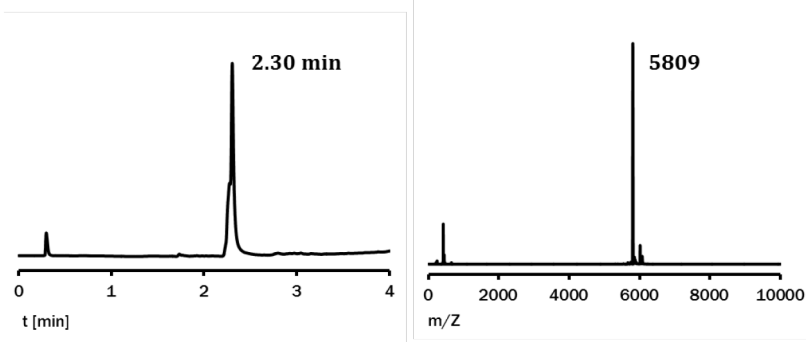
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 5806.31 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 5809^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 33% (9.8 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Gly-Cttt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-Ahx-(KIAALKE)₃G (**29**)

HPLC-Gradient:

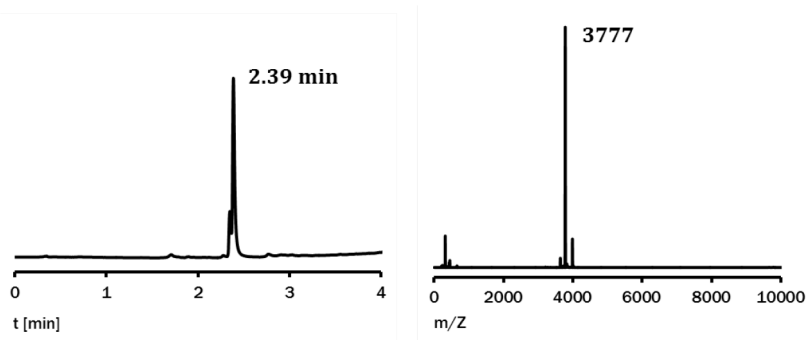
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 3775.42 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 3777^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 20% (6 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 25,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Das Chromatogramm könnte auf kleinere Verunreinigungen schließen lassen. In Anbetracht der Menge wurde jedoch von einer weiteren Aufreinigung abgesehen.

Gly-^Ccc tgc tta tgt^N-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-Ahx-(KIAALKE)₃G (**30**)

HPLC-Gradient:

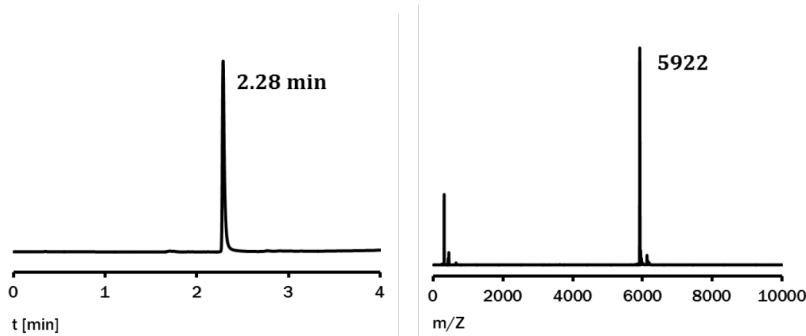
20 – 50% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 5919.46 \text{ g/mol}$

MALDI-TOF_{gef} = 5922^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 29% (8.6 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-^Ntgt att cgt cc^C-Lys(**ALO**)N₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-Ahx-(KIAALKE)₃G (**34**)

HPLC-Gradient:

15 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 6032.61 \text{ g/mol}$

ESI-MS_{ges} = [1207.5]⁵⁺, [1006.4]⁶⁺

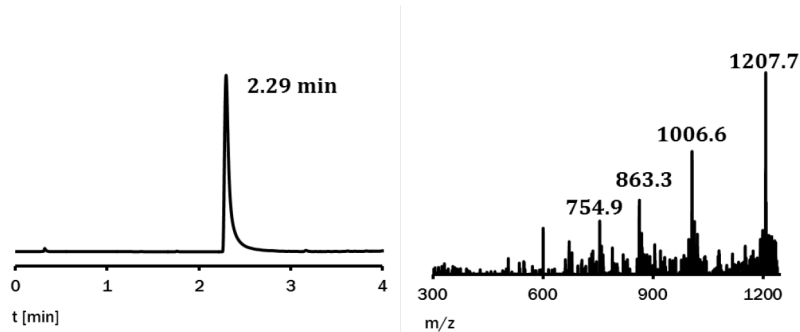
[862.8]⁷⁺

ESI-MS_{gef} = [1207.7]⁵⁺, [1006.6]⁶⁺,

[863.3]⁷⁺

Ausbeute: 30% (240 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 99,800 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Ac-^Ngcc ttt gta ttc gtc c^C-Lys(**ALO**)N₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-Ahx-(KIAALKE)₃G (**35**)

HPLC-Gradient:

15 – 75% Laufmittel B

M_{calc} = 7358.88 g/mol

ESI-MS_{ges} = [1227.5]⁶⁺,

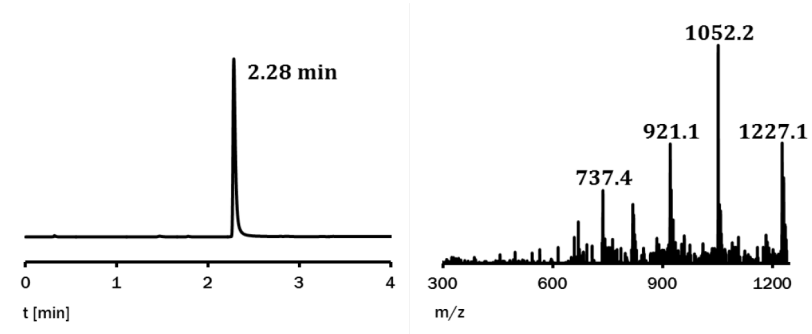
[1052.3]⁷⁺, [920.9]⁸⁺

ESI-MS_{gef} = [1227.1]⁶⁺,

[1052.2]⁷⁺, [921.1]⁸⁺

Ausbeute: 4% (16 nmol)

ε_{260nm} = 141,900 L/(mol·cm)



Peptid-PNA-Konjugate aus Kapitel 4.2)

Gly-^Cttt^N-Lys(**TMR**)-**ALON**₃(CH₂)₅(CO)-MPAA-Ahx-(KIAALKE)₃G (**41**)

HPLC-Gradient:

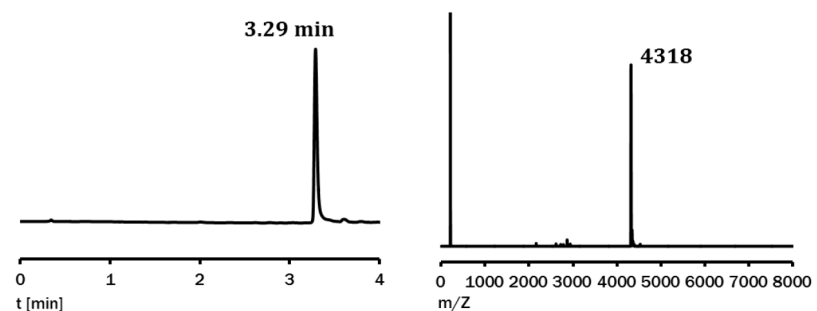
30 – 50% Laufmittel B

M_{calc} = 4316.03 g/mol

MALDI-TOF_{gef} = 4318^{[M+H]⁺}

Ausbeute: 14% (4.2 nmol)

ε_{260nm} = 57,800 L/(mol·cm)



Peptid-PNA-Konjugate aus Kapitel 4.7)

Ac-^Ntcg tcc^C-GC NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVG YIGE RCQYRDLKWW ELR (**114**)

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

M_{calc} = 8000.71 g/mol

ESI-MS_{ges} = [1144.0]⁷⁺,

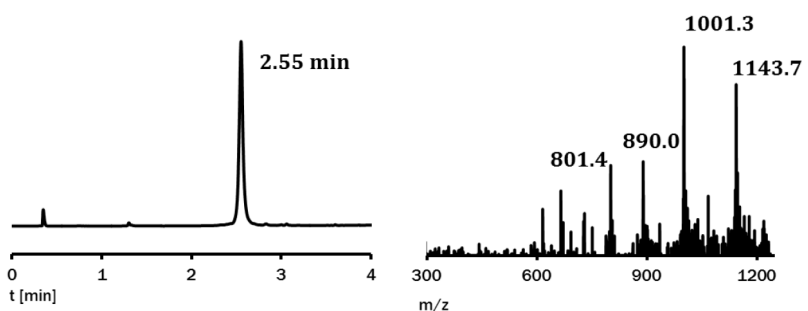
[1001.1]⁸⁺, [890.0]⁹⁺

ESI-MS_{gef} = [1143.7]⁷⁺,

[1001.3]⁸⁺, [890.0]⁹⁺

Ausbeute: 8% (16 nmol)

ε_{260nm} = 58,466 L/(mol·cm)



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Ac-^N tgt att cgt cc^C-GC NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVGYIGE RCQYRDLKWW
ELR (**115**)

HPLC-Gradient:

20 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 9366.00 \text{ g/mol}$

ESI-MS_{ges} = [1171.8]⁸⁺,

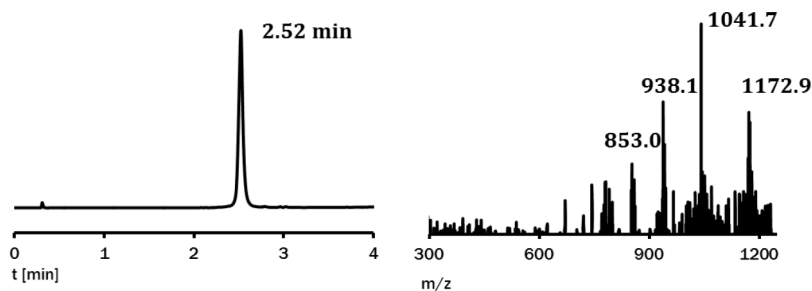
[1041.7]⁹⁺, [937.6]¹⁰⁺

ESI-MS_{gef} = [1172.9]⁸⁺,

[1041.7]⁹⁺, [938.1]¹⁰⁺

Ausbeute: 8% (16 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 109,566 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-^Ntcg tcc^C-GC VVSHFNDCPD SHTQFCFHGT CRFLVQEDKP ACVCHSGYVG ARCEHADLLA (**116**)

HPLC-Gradient:

15 – 70% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 7330.94 \text{ g/mol}$

ESI-MS_{ges} = [1222.8]⁶⁺,

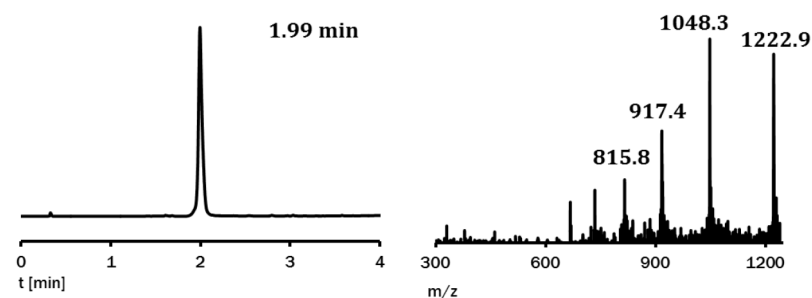
[1048.3]⁷⁺, [917.4]⁸⁺

ESI-MS_{gef} = [1222.9]⁶⁺,

[1048.3]⁷⁺, [917.4]⁸⁺

Ausbeute: 8% (16 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 49,984 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



Ac-^N tgt att cgt cc^C-GC VVSHFNDCPD SHTQFCFHGT CRFLVQEDKP ACVCHSGYVG ARCEHADLLA
(**117**)

HPLC-Gradient:

15 – 70% Laufmittel B

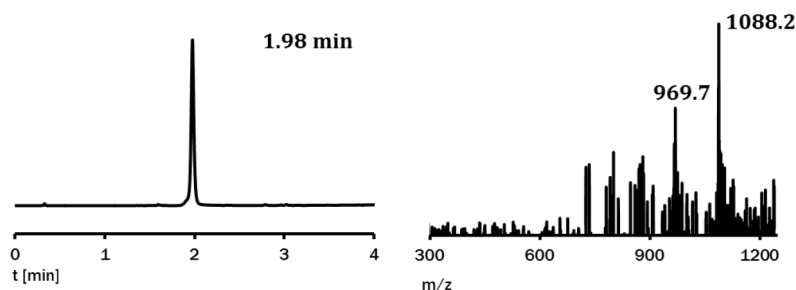
$M_{\text{calc}} = 8696.23 \text{ g/mol}$

ESI-MS_{ges} = [1088.0]⁸⁺, [967.2]⁹⁺

ESI-MS_{gef} = [1088.2]⁸⁺, [969.7]⁹⁺

Ausbeute: 3% (6 nmol)

$\epsilon_{260\text{nm}} = 101,084 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$



7.2) Hergestellte Verbindungen und Analytik

Ac-N^g gcc ttt gta ttc gtc c^c-GSKGGC NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVG YIGE
RCQYRDLKWW ELR (**127**)

HPLC-Gradient:

0% für 5 min, dann

20 – 80% Laufmittel B

$M_{\text{calc}} = 11021.61 \text{ g/mol}$

ESI-MS_{ges} = [1225.6]⁹⁺,

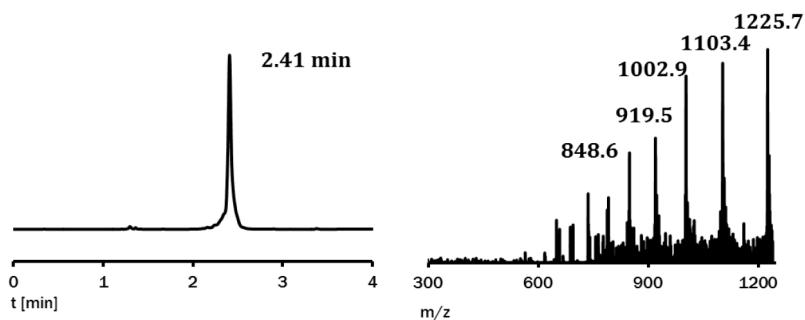
[1103.2]¹⁰⁺, [1003.0]¹¹⁺

ESI-MS_{gef} = [1225.7]⁹⁺,

[1103.4]¹⁰⁺, [1002.9]¹¹⁺

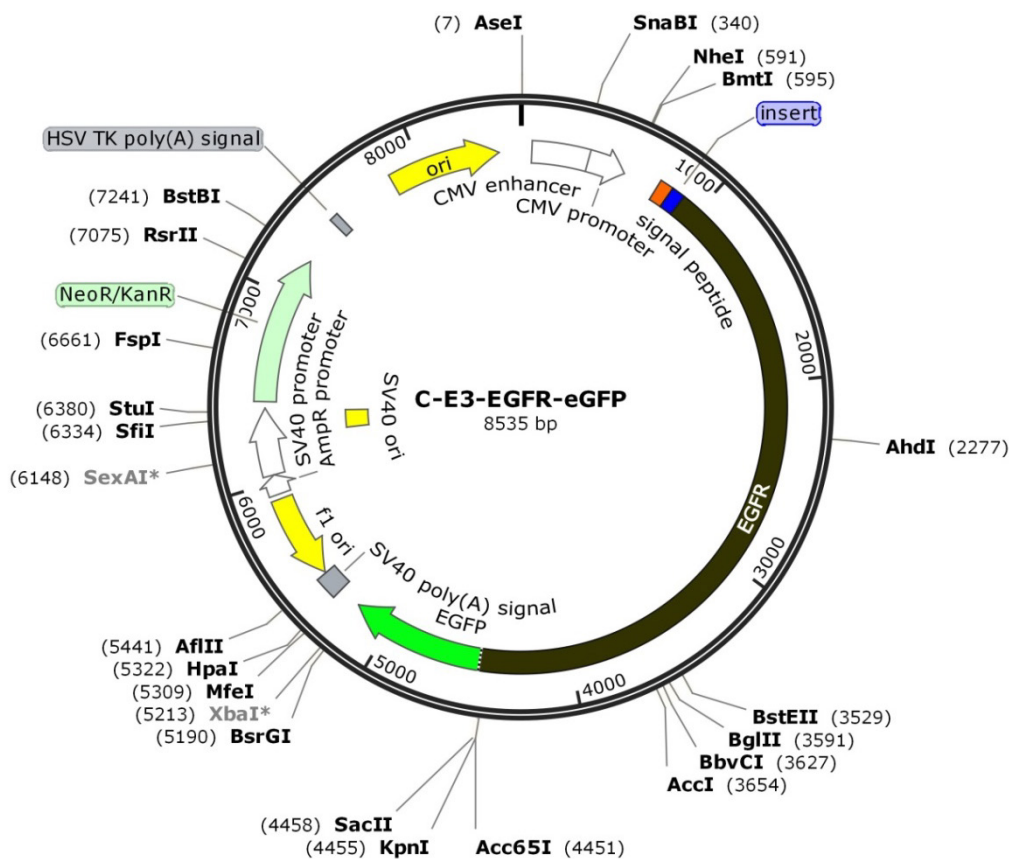
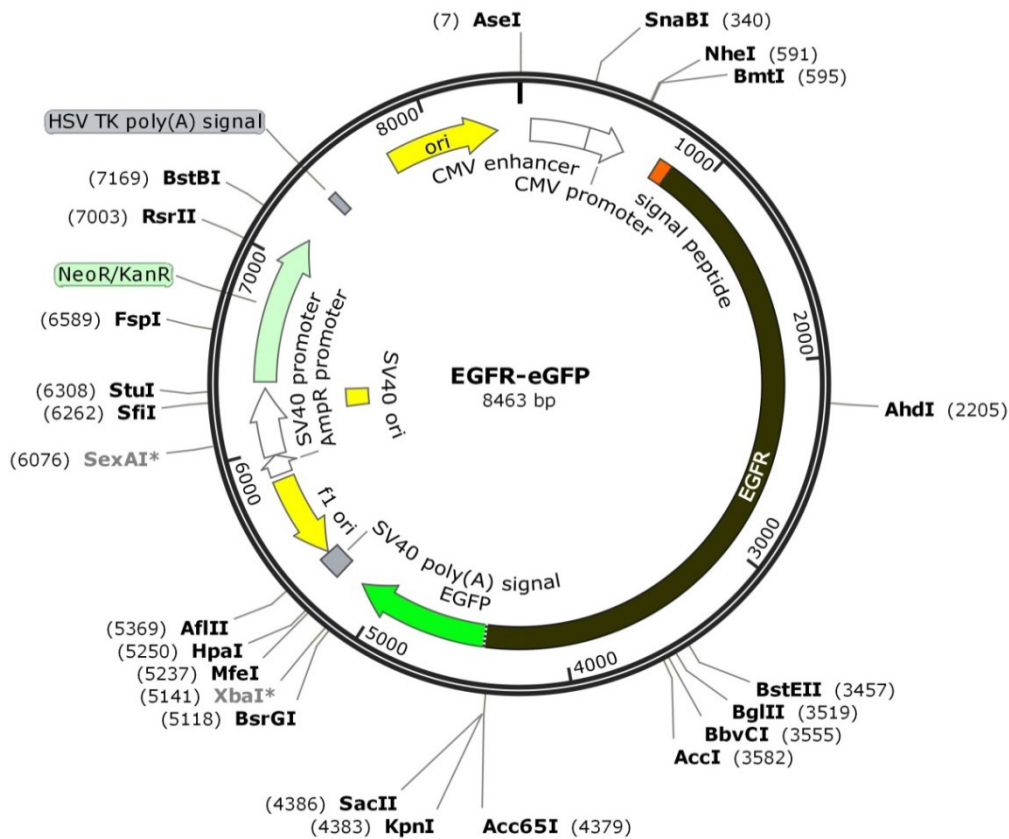
Ausbeute: 6% (48 nmol)

$\varepsilon_{260\text{nm}} = 151,666 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$



7.3) Anlagen zu biochemischen Methoden und ergänzende Messungen

7.3.1) Vektorkarten



7.3.2) Fluoreszenzmikroskopie

7.3.2.1) Ergänzende Mikroskopie zu Kapitel 4.2.2

Es sollte sichergestellt werden, dass der C-E3-tag zugänglich ist und das Cystein N-terminal exprimiert wird. Hierfür wurde zunächst nur der Farbstoff TMR durch den TMR-MPAA-Donor **45** übertragen. Hierfür wurden die Zellen für 10 min mit 0.1 mM TCEP in PBS behandelt. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und für 2 min mit 100 nM Donor **45** inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden sie in PBS unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Allein die Zellen, die mit dem C-E3-modifizierten EGFR-eGFP transfiziert wurden, nicht jedoch jene mit dem ursprünglich EGFR-eGFP-Vektor zeigten auch im TMR-Kanal Markierungen. Dies ist ein Anzeichen für den Transfer des TMR-Fluorophors auf den Rezeptor, allerdings noch kein eindeutiger Beleg für die tatsächliche Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die Coiled-Coil-Interaktion des Donorpeptids würde das gleiche Bild ergeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen für 2 min mit basischem Puffer (200 nM NaHCO₃ in PBS) bei pH 9.0 behandelt, was den Thioester hydrolysiert und ein Signal durch nicht-kovalente Bindung auslöschen würde. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte weiterhin eine Markierung beobachtet werden, was den Transfer des Fluorophors und damit die korrekte Expression des N-terminalen Cysteins belegt. Allerdings muss angemerkt werden, dass diese drastische Behandlung zu Schäden in der Zellmorphologie führte. Die erzeugte C-E3-EGFR-eGFP-Mutante konnte auch zur nicht-kovalenten Markierung durch das gezeigte Kontrollpeptid genutzt werden. Hier ist keine Thioesterfunktionalität vorhanden und die Markierung, welche selektiv für C-E3-EGFR-eGFP-, nicht jedoch für EGFR-eGFP-transfizierte Zellen beobachtet werden kann, verläuft nicht-kovalent. Auch diese Markierung ist stabil gegenüber basischen Bedingungen.

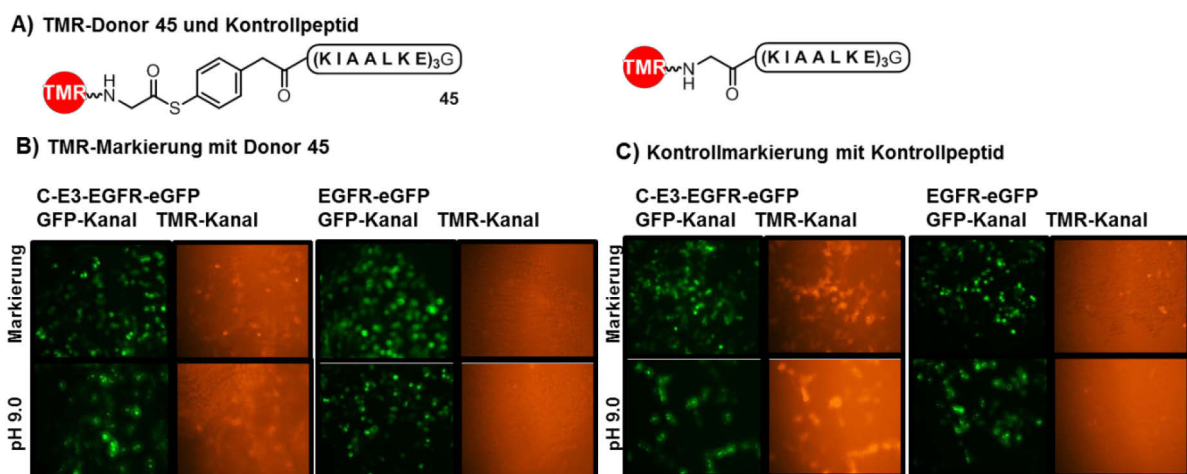
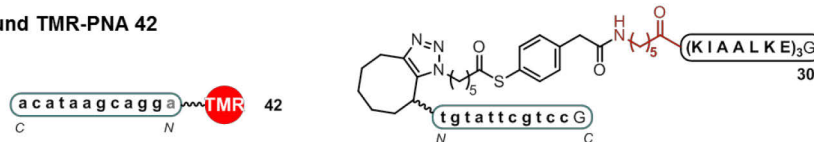
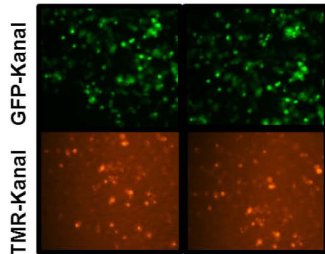
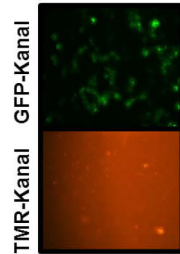


Abb. 85 A) TMR-Donor **45** für die kovalente und TMR-Peptid für die nicht-kovalente Markierung von C-K3-versehenen Proteinen. B) Vergleich der kovalenten Markierung von HEK293-Zellen mit C-E3-EGFR-eGFP-Transfektion (links) und EGFR-eGFP-Transfektion (rechts). Markierte Zellen wurden mit basischem Puffer behandelt (unten). C) Vergleich der nicht-kovalenten Markierung von HEK293-Zellen mit C-E3-EGFR-eGFP-Transfektion (links) und EGFR-eGFP-Transfektion (rechts). Markierte Zellen wurden mit basischem Puffer behandelt (unten).

A) PNA-Donor 30 und TMR-PNA 42


B) TMR-Markierung mit Donor 30
Markierung pH 9.0

C) TMR-PNA 42
Kontrolle


D) Markierung mit fluoreszenter DNA

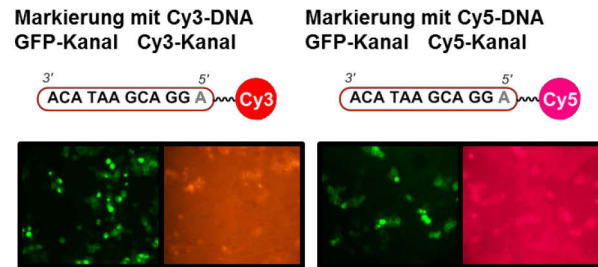


Abb. 86 A) PNA-Donor **30** und Sekundär-PNA **42** zur Markierung C-E3-EGFR-eGFP-exprimierender HEK293-Zellen. B) Mikroskopie in GFP- und TMR-Kanal der markierten Zellen vor (links) und nach dem basischen Waschen (rechts). C) Kontrolle durch Inkubation der transfizierten Zellen mit TMR-PNA ohne vorhergehenden Transfer. D) Mikroskopie Zellen nach 2-Schritt-Markierung unter Verwendung des PNA-Donors 30 und Cy3- / Cy5-markierten DNA-Strängen.

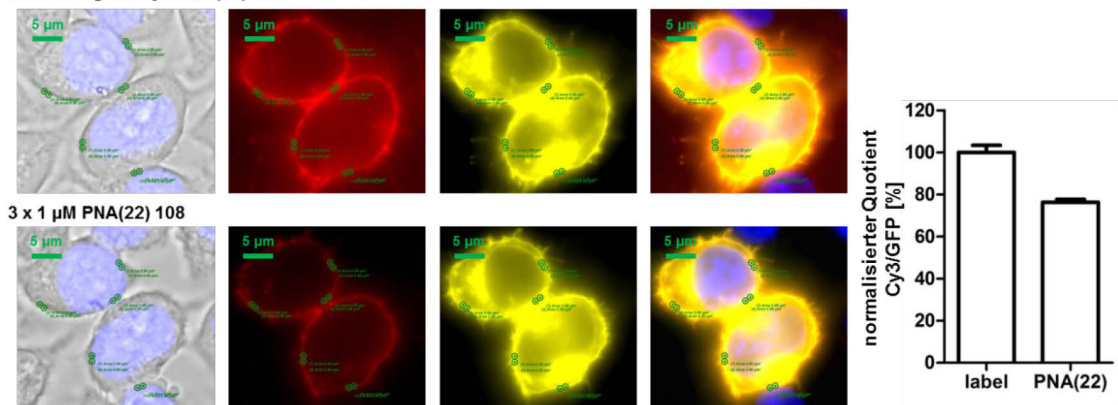
Analog der Markierung von GPCRs wurden HEK293-Zellen mit C-E3-EGFR-eGFP transfiziert und zur 2-Schritt-Markierung über PNA-PNA-Interaktion genutzt. Die mit TCEP-behandelten Zellen wurden für 2 min mit dem 11mer-PNA-Donor **30** inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen, für 2 min mit 500 nM TMR-PNA **42** in PBS behandelt und nach erneutem Waschen in PBS-Puffer mikroskopiert (Abb. 86B). Neben der Markierung von Zellen konnte vereinzelt eine unspezifische Fluoreszenz von Zelltrümmern beobachtet werden, die auch dann auftrat, wenn kein Donor zuvor verwendet wurde (Abb. 86C). Um den Hintergrund, der durch den hydrophoben Charakter von PNA-PNA-Doppelsträngen entstehen kann zu minimieren, wurde im nächsten Schritt die Anwendbarkeit von fluoreszenter DNA im zweiten Schritt untersucht. Nach der Inkubation mit 0.1 mM TCEP in PBS-Puffer für 10 min wurden die Zellen gewaschen, mit 100 nM Donor **30** für 3 min markiert, erneut gewaschen und für 5 min mit 1 μ M Sekundär-DNA **47** mit einem Cy3-Farbstoff oder einer analogen DNA mit Cy5-Farbstoff behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mikroskopiert (Abb. 86D). Hier zeigte sich wie erwartet eine Zellmarkierung mit geringerem unspezifischem Hintergrund. Zudem wird hier die einfache Austauschbarkeit der Fluorophore demonstriert.

7.3.2.2) Quantifizierung zu Kapitel 4.6.3

In jeder Aufnahme wurden zehn Punkte entlang der Membran einer markierten Zelle so gewählt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb des Detektionslimits lag. Fehler durch starke Überexpression des EGFR und damit ein punktuell über der Detektionsgrenze liegendes GFP-Signal wurden somit ausgeblendet. Dieselben zehn Punkte mit einer Fläche von je $0.96 \mu\text{m}^2$ wurden in der Aufnahme nach dreifacher Inkubation mit jeweils $1 \mu\text{M}$ PNA **108** betrachtet. Es wurde jeweils die mittlere Intensität im TRITC- (für Cy3) und YFP- (für GFP) –Kanal vor Durchführung der Wiener-Dekonvolution bestimmt. Für jeden Punkt wurde der Quotient aus Cy3/GFP gebildet und der Mittelwert über alle zehn Punkte bestimmt. Das Verhältnis Cy3/GFP vor der Anwendung von PNA **108** wurde auf 100% normiert.

A) Verdrängungsexperiment mit Cy3- und GFP-Intensitätsbestimmung

Markierung mit Cy3-DNA(22) 109



B) Kontrollexperiment mit Cy3- und GFP-Intensitätsbestimmung

Markierung mit Cy3-DNA(16) 47

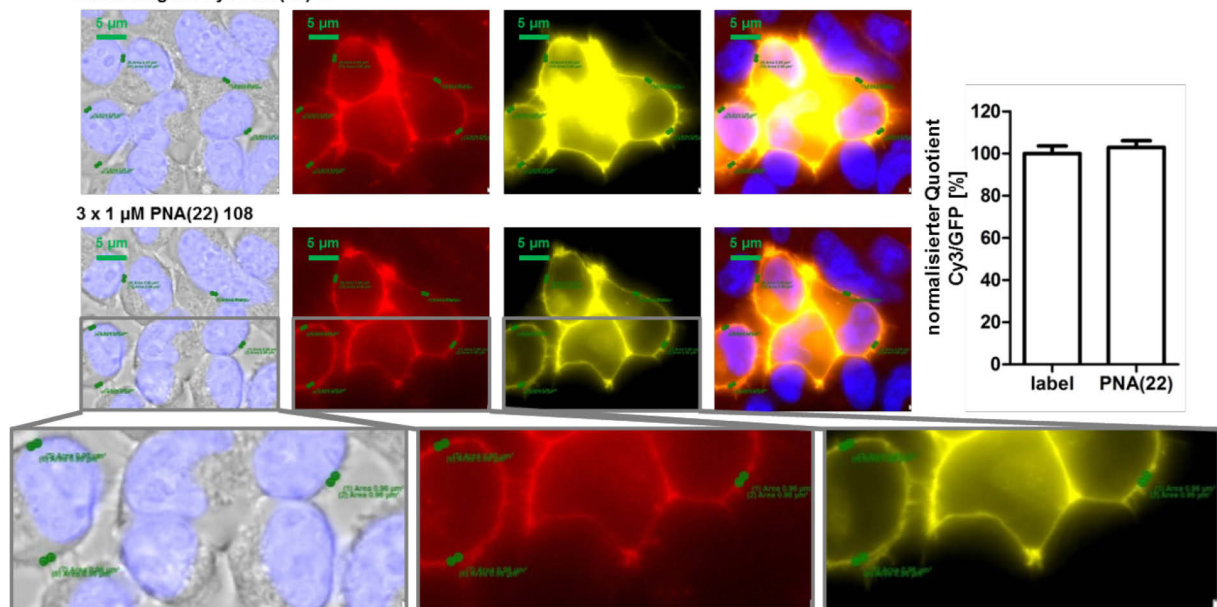
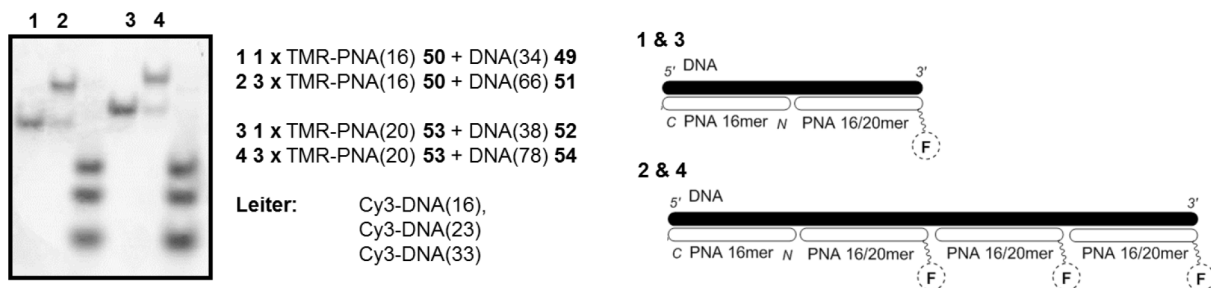


Abb. 87 Messpunkte entlang der Zellmembran, die zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität für das Signal von eGFP und Cy3 genutzt wurden und das daraus abgeleitet normalisierte Verhältnis von Cy3 zu eGFP. Nicht durch Dekonvolution bereinigte Bilder für A) das Verdrängungs- und B) das Kontroll-experiment. Die Vergrößerung (unten) verdeutlicht die Wahl der Messpunkte.

7.3.3) Gelelektrophorese

Gele aus Kapitel 4.2

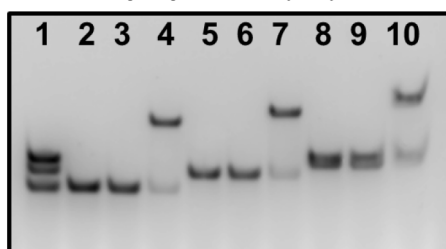
Zum Nachweis der Mehrfachpräsentation der TMR-PNA an der entsprechenden Konnektor-DNA wurde je ein bzw. drei Äquivalente an TMR-PNA **50** bzw. **53** in Kombination mit der jeweiligen DNA in 1 μ M Konzentration hybridisiert und im nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Das Auslesen wurde über TMR-Fluoreszenz der PNA vorgenommen. Es zeigt sich eine Bande mit höherer Masse, wenn drei PNA-Oligomere an Strang **51** oder **54** hybridisiert wurden.



Gele zu Kapitel 4.6 und 4.7

Es sollte die Duplexbildung von PNA(6) und PNA(11) **98** mit den FAM-markierten Überhangverlängerten DNA-Sequenzen **99**, **101** und **103** untersucht werden. Hierfür wurde ein natives Polyacrylamid-Gel mit den vorab hybridisierten Komplexen (1 μ M in Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) beladen und für 100 min bei 200 V Spannung bei 4 °C die elektrophoretische Trennung durchgeführt. Die Komplexe wurden bei den FAM-spezifischen Wellenlängen ausgelesen ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$).

Natives Polyacrylamid-Gel (20%)



1 Leiter: DNA(15)FAM **99**, DNA(17)FAM **101**, DNA(19)FAM **103**

2 DNA(15)FAM
3 DNA(15)FAM+PNA(6)
4 DNA(15)FAM+PNA(11)

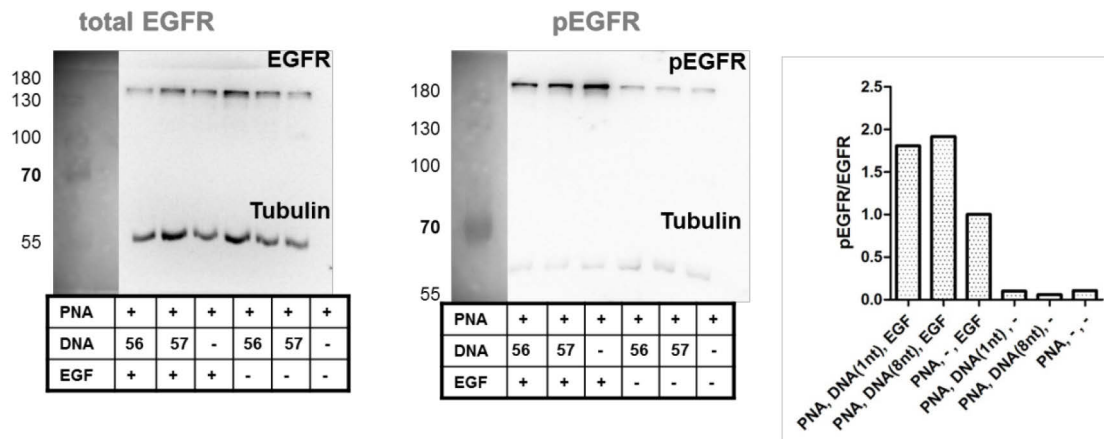
5 DNA(17)FAM
6 DNA(17)FAM+PNA(6)
7 DNA(17)FAM+PNA(11)

8 DNA(19)FAM
9 DNA(19)FAM+PNA(6)
10 DNA(19)FAM+PNA(11)



7.3.4) Western Blots

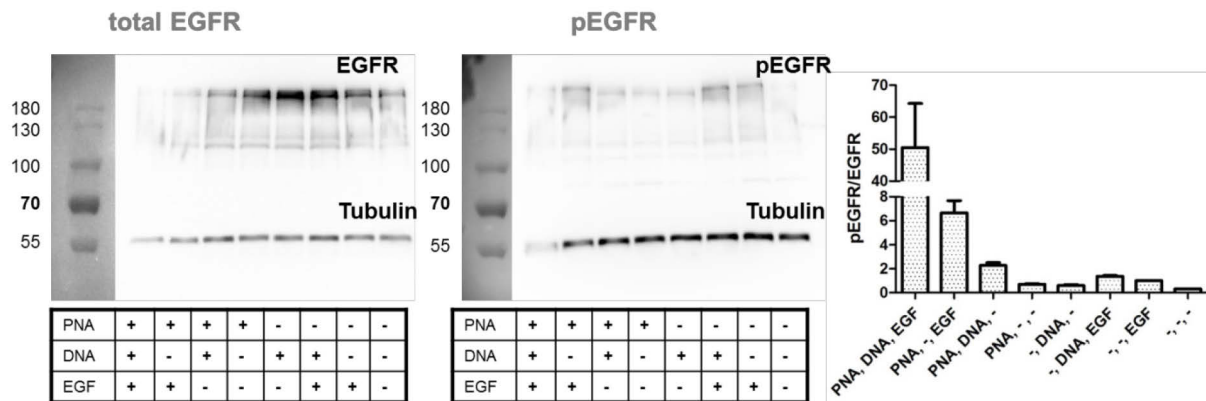
1) Erste Dimerisierungsexperimente (Abb. 46A)



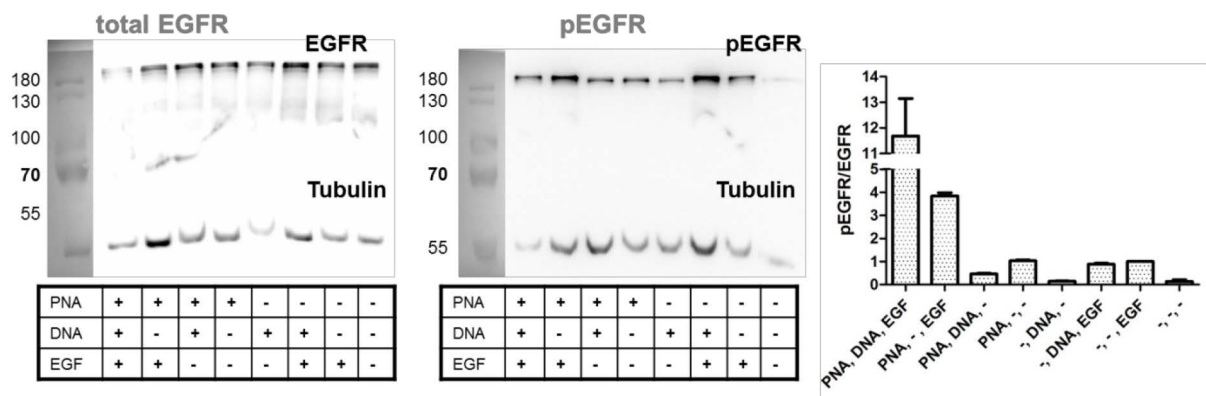
2) Dimerisierungsexperimente Blot I und II (Abb. 46B)

Beide Blots wurden dreifach ausgelesen, um den Fehler beim Auslesen durch die schwache EGFR-Bande statistisch zu minimieren.

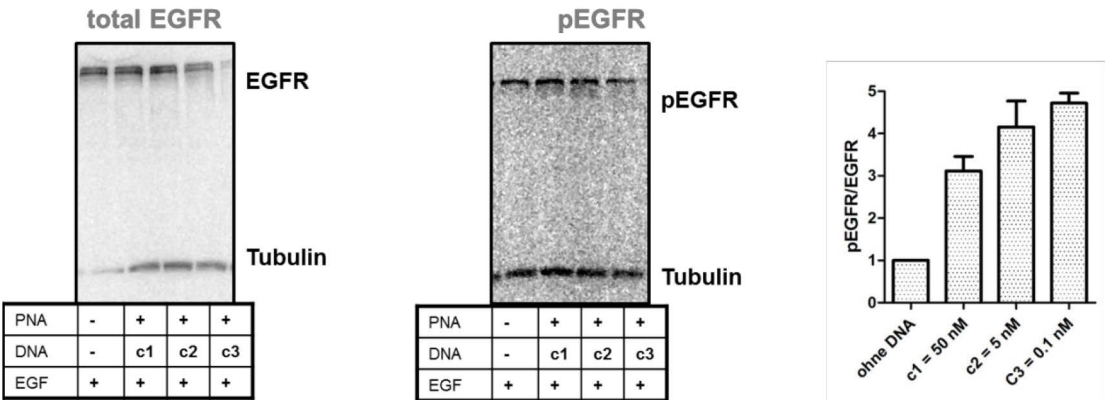
Blot I



Blot II



3) Dimerisierungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen an DNA (Abb. 46D)



7.3.5) Fluoreszenzspektroskopie

Ergänzungen zu Kapitel 4.6

In Vorabexperimenten wurden Emissionsspektren aufgenommen, welche die Änderung der FAM-Fluoreszenz bei Zugabe von PNA bzw. Löscher-PNA angaben. In einer 0.5 μM Konzentration in entgastem Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0, 25 °C) zeigte die FAM-DNA **99** eine maximale Fluoreszenz $\lambda_{\text{MAX}} = 518 \text{ nm}$ mit einer Intensität von 350 – 400 Einheiten (grau). Die Zugabe der 11-Monomer-langen PNA **98** erzeugte eine geringfügige Verschiebung auf $\lambda_{\text{MAX}} = 520 \text{ nm}$ und eine minimale Erhöhung der Intensität (blau, linkes Spektrum). Zugabe eines Äquivalents Löscher-PNA führte zu einer schnelleren Absenkung der Fluoreszenzintensität (dunkelgrün) in Abwesenheit von PNA **98** (rechtes Spektrum). Nach einer halben Stunde war die Fluoreszenzintensität in beiden Fällen vergleichbar. Ein anschließendes Erhitzen und Abkühlen zeigte in beiden Fällen keine weitere Änderung des Spektrums und dessen Intensität (rot, untere Spektren).

Als hinderlich für die Verdrängung zeigte sich die Wahl der Überhangsequenz, da im Fall der 8mer-Verlängerung eine intramolekulare Haarnadelstruktur entstehen konnte. Diese muss für den Prozess der Verdrängung erst gebrochen werden und erfordert somit zusätzlichen energetischen Aufwand.

- 1) grau: 0.5 μM FAM-DNA(15) **99**
- 2) dunkelblau: Zugabe von PNA(11) **98** und Hybridisierung bei 90-25 °C
- 3) dunkelgrün: Zugabe von Q-PNA(15) **100**
- 4) hellgrün: 30 min bei 25 °C
- 5) rot: Hybridisierung bei 90-25 °C

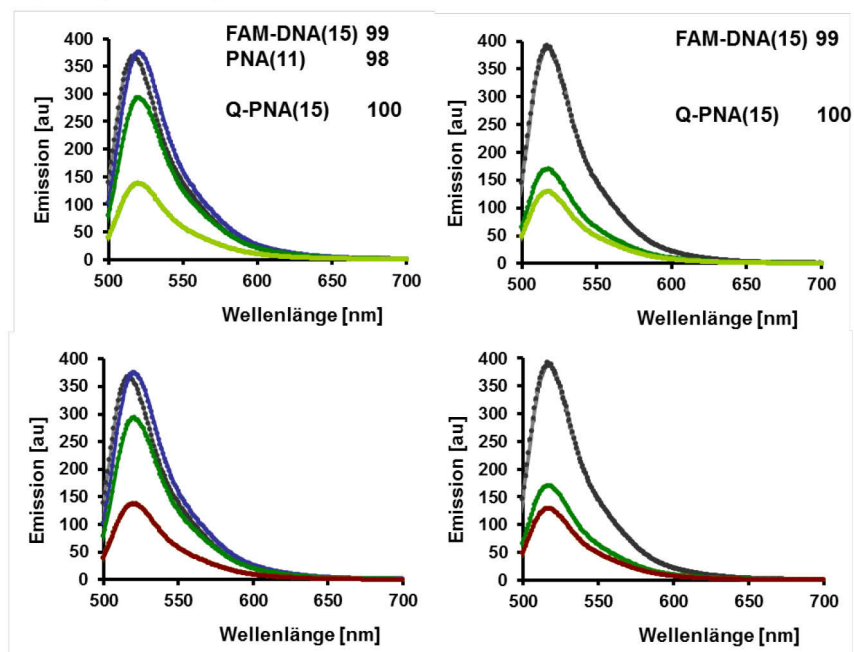


Abb. 88 Emissionsspektrum vor und nach der Verdrängung.

7.4) Danksagung

Ich bedanke mich in erster Linie bei Prof. Oliver Seitz, der mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglichte. Der Dank gilt gleichermaßen für die Unterstützung und Konsultation, wie auch das Vertrauen und die Freiheiten, die ich in der Ausarbeitung der Konzepte erlebt habe. Dem Verband der chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung in den ersten zwei Jahren und die Möglichkeit zur Fortbildung und Netzwerkpflege. Ich bedanke mich ebenso bei allen Beteiligten des SPP1623 für die Förderung der Forschung und die Möglichkeit des interdisziplinären Austauschs.

Ein besonderer Dank gilt auch den Kooperationspartner von der Universität Leipzig: Prof. Annette G. Beck-Sickinger, Dr. Jonathan Lotze, Philipp Wolf und alle weiteren Beteiligten, welche wichtige Anwendungen der entwickelten Methoden möglich gemacht haben.

Der ganzen Arbeitsgruppe Seitz und vor allem jenen, die den Laboralltag fröhlich, die Hürden überwindbar und die Geräte benutzbar machten, spreche ich einen herzlichen Dank aus. Ich durfte in den vergangenen Jahren auf eine Atmosphäre der Kollegialität und des Zusammenhalts zurückblicken. Besonders Dr. Dominic Gröger, Gunnar Bachem, Jasmine Chamiolo und Dr. Christina Kuznia danke ich für die Korrekturlesung dieser Arbeit. Ich bedanke mich zudem bei meinen Laborkollegen Natali Dubel, Dr. Ramon Subiros Funosas, Brigitte Redlich und Dr. Andrea Knoll für die schöne Zeit im Labor.

Christina Klotz danke ich für die Pflege der Zellen und Amplifikation der Vektoren, sodass ich immer zügig Experimente an zufriedenen Zellen durchführen konnte. Für die Hilfe und Konsultation in allen Bereichen der Biologie danke ich auch ganz besonders Dr. Christina Kuznia. Ich bedanke mich bei den Bachelor-Studenten (Murat Eskin und Angelique Ladwig) und Auszubildenden (Anne Mohr und Michelle Matschke), die mit ihren Arbeiten zu dieser Dissertation beigetragen haben und vor allem bei meinem Forschungspraktikanten Marc Reimann, welcher ein exzeptioneller Mitarbeiter und toller Zeitgenosse im Labor war.

Ein außerordentlicher Dank von ganzem Herzen gilt meinen Eltern. Ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und der Rückhalt, den sie mir gegeben haben, haben mich die ganze Zeit über begleitet. Auch meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken. Sie haben mit mir genauso die guten Zeiten gefeiert, wie die schweren Momente überwunden.

7.5) Literaturverzeichnis

- [1] R. Roskoski Jr, *Pharmacol. Res.* **2014**, *79*, 34-74.
- [2] S. Morandell, T. Stasyk, S. Skvortsov, S. Ascher, L. A. Huber, *Proteomics* **2008**, *8*, 4383-4401.
- [3] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi, H. Kitano, *Mol. Syst. Biol.* **2005**, *1*, 2005.0010-2005.0010.
- [4] W. X. Schulze, L. Deng, M. Mann, *Mol. Syst. Biol.* **2005**, *1*, 2005.0008.
- [5] R. Avraham, Y. Yarden, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2011**, *12*, 104-117.
- [6] R. Milo, *BioEssays* **2013**, *35*, 1050-1055.
- [7] G. Ashkenasy, T. M. Hermans, S. Otto, A. F. Taylor, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2543-2554.
- [8] M. J. C. Long, J. R. Poganik, Y. Aye, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3610-3622.
- [9] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Darnedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472-10498.
- [10] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368.
- [11] O. Vázquez, O. Seitz, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 78-86.
- [12] V. Singh, *Syst. Synth. Biol.* **2014**, *8*, 271-282.
- [13] C. Greenwood, D. Ruff, S. Kirvell, G. Johnson, H. S. Dhillon, S. A. Bustin, *Biomol. Det. Quant.* **2015**, *4*, 10-16.
- [14] T. Hayashi, I. Hamachi, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1460-1469.
- [15] M. Di Pisa, O. Seitz, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 872-882.
- [16] K. Gorska, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6820-6843.
- [17] B. Sacca, C. M. Niemeyer, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5910-5921.
- [18] F. Hong, F. Zhang, Y. Liu, H. Yan, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12584-12640.
- [19] S. Barluenga, N. Winssinger, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1319-1331.
- [20] Y. Bai, Q. Luo, J. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2756-2767.
- [21] D. N. Woolfson, in *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*, Vol. 82 (Eds.: D. A. D. Parry, J. M. Squire), Springer International Publishing AG, **2017**, pp. 35-61.
- [22] H. Gradišar, R. Jerala, *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 4.
- [23] D. J. Glover, D. S. Clark, *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 438-444.
- [24] Q. Luo, C. Hou, Y. Bai, R. Wang, J. Liu, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13571-13632.
- [25] S. van de Linde, S. Aufmkolk, C. Franke, T. Holm, T. Klein, A. Löschberger, S. Proppert, S. Wolter, M. Sauer, *Chemistry & Biology* **2013**, *20*, 8-18.
- [26] W. Engelen, B. M. G. Janssen, M. Merckx, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3598-3610.
- [27] H. Zhang, F. Li, B. Dever, X.-F. Li, X. C. Le, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2812-2841.
- [28] Y. Yano, K. Kawano, K. Omae, K. Matsuzaki, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 504 (Ed.: P. M. Conn), Academic Press, **2012**, pp. 355-370.
- [29] J. Cappello, H. Ghandehari, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1053-1055.
- [30] Y. B. Yu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1113-1129.
- [31] K. K. Sadhu, M. Röthlingshöfer, N. Winssinger, *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 75-86.
- [32] F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5789-5801.
- [33] C. Yewale, D. Baradia, I. Vhora, S. Patil, A. Misra, *Biomaterials* **2013**, *34*, 8690-8707.
- [34] R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [35] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [36] P. J. Cranfill, B. R. Sell, M. A. Baird, J. R. Allen, Z. Lavagnino, H. M. de Gruiter, G.-J. Kremers, M. W. Davidson, A. Ustione, D. W. Piston, *Nat. Meth.* **2016**, *13*, 557-562.
- [37] R. N. Day, M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2887-2921.
- [38] M. B. Stone, S. A. Shelby, S. L. Veatch, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7457-7477.
- [39] Q. Zheng, M. F. Juetz, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044-1056.
- [40] A. F. L. Schneider, C. P. R. Hackenberger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *48*, 61-68.
- [41] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498-500.

7.5) Literaturverzeichnis

- [42] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16-20.
- [43] M. King, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825-839.
- [44] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [45] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [46] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [47] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [48] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [49] O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174-2195.
- [50] M. Gullberg, S. M. Gústafsdóttir, E. Schallmeiner, J. Jarvius, M. Bjarnegård, C. Betsholtz, U. Landegren, S. Fredriksson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8420-8424.
- [51] N. Padhan, J. Yan, A. Boge, E. Scrivener, H. Birgisson, A. Zieba, M. Gullberg, M. Kamali-Moghaddam, L. Claesson-Welsh, U. Landegren, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1490.
- [52] T. Hayashi, Y. Yasueda, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5372-5380.
- [53] Z. Li, D. Wang, L. Li, S. Pan, Z. Na, C. Y. J. Tan, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9990-9998.
- [54] M. B. Minus, W. Liu, F. Vohidov, M. M. Kasembeli, X. Long, M. J. Krueger, A. Stevens, M. I. Kolosov, D. J. Tweardy, E. A. R. Sison, M. S. Redell, Z. T. Ball, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13085-13089.
- [55] P. V. Robinson, G. de Almeida-Escobedo, A. E. de Groot, J. L. McKechnie, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10452-10455.
- [56] M. Famulok, G. Mayer, M. Blind, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591-599.
- [57] K. Viehweger, L. Barbaro, K. P. García, T. Joshi, G. Geipel, J. Steinbach, H. Stephan, L. Spiccia, B. Graham, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1011-1022.
- [58] C. Stiller, D. M. Krüger, N. Brauckhoff, M. Schmidt, P. Janning, H. Salamon, T. N. Grossmann, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 504-509.
- [59] T. Yamaguchi, M. Asanuma, S. Nakanishi, Y. Saito, M. Okazaki, K. Dodo, M. Sodeoka, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1021-1029.
- [60] D. Hymel, Z. R. Woydziak, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5241-5244.
- [61] D. Jung, K. Sato, K. Min, A. Shigenaga, J. Jung, A. Otaka, Y. Kwon, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9670-9673.
- [62] S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9046-9054.
- [63] Y. Hori, K. Kikuchi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 644-650.
- [64] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341-343.
- [65] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805-809.
- [66] G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 81-95.
- [67] S.-h. Uchinomiya, H. Nonaka, S.-h. Fujishima, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2009**, 5880-5882.
- [68] T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6782-6785.
- [69] M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 509-512.
- [70] T. Masuya, M. Murai, K. Ifuku, H. Morisaka, H. Miyoshi, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2307-2317.
- [71] T. Masuya, M. Murai, H. Morisaka, H. Miyoshi, *Biochemistry* **2014**, *53*, 7816-7823.
- [72] Y.-L. Yang, Y.-P. Lee, Y.-L. Yang, P.-C. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 390-397.
- [73] D. J. Kleinbaum, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8154-8156.
- [74] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277-1294.
- [75] J. Lotze, U. Reinhardt, O. Seitz, A. G. Beck-Sickinger, *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 1731-1745.
- [76] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341-345.
- [77] U. Reinhardt, J. Lotze, S. Zernia, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10237-10241.

7.5) Literaturverzeichnis

- [78] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [79] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, 382, 525-528.
- [80] K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, 389, 706-709.
- [81] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chemistry & Biology* **1996**, 3, 49-56.
- [82] U. Reinhardt, J. Lotze, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 2106-2117.
- [83] J. Wang, Y. Yu, J. Xia, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 178-187.
- [84] Y. Yano, N. Furukawa, S. Ono, Y. Takeda, K. Matsuzaki, *Pept. Sci.* **2016**, 106, 484-490.
- [85] B. V. Popp, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6660-6662.
- [86] D. N. Woolfson, in *Adv. Protein Chem., Vol. Volume 70*, Academic Press, **2005**, pp. 79-112.
- [87] A. N. Lupas, J. Bassler, *Trends Biochem. Sci* **2017**, 42, 130-140.
- [88] K. Wagschal, B. Tripet, C. Mant, R. S. Hodges, P. Lavigne, *Protein Sci.* **1999**, 8, 2312-2329.
- [89] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Pept. Res.* **2001**, 58, 477-492.
- [90] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**.
- [91] D. A. Lindhout, J. R. Litowski, P. Mercier, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biopolymers* **2004**, 75, 367-375.
- [92] I. Drobnak, H. Gradišar, A. Ljubetič, E. Merljak, R. Jerala, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**.
- [93] J. M. Fletcher, R. L. Harniman, F. R. H. Barnes, A. L. Boyle, A. Collins, J. Mantell, T. H. Sharp, M. Antognozzi, P. J. Booth, N. Linden, M. J. Miles, R. B. Sessions, P. Verkade, D. N. Woolfson, *Science* **2013**, 340, 595-599.
- [94] S. E. Boyken, Z. Chen, B. Groves, R. A. Langan, G. Oberdorfer, A. Ford, J. M. Gilmore, C. Xu, F. DiMaio, J. H. Pereira, B. Sankaran, G. Seelig, P. H. Zwart, D. Baker, *Science* **2016**, 352, 680-687.
- [95] C. Xu, R. Liu, A. K. Mehta, R. C. Guerrero-Ferreira, E. R. Wright, S. Dunin-Horkawicz, K. Morris, L. C. Serpell, X. Zuo, J. S. Wall, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15565-15578.
- [96] F. Thomas, N. C. Burgess, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *Angew. Chem.* **2016**, 128, 999-1003.
- [97] E. H. Egelman, C. Xu, F. DiMaio, E. Magnotti, C. Modlin, X. Yu, E. Wright, D. Baker, V. P. Conticello, *Structure* **2015**, 23, 280-289.
- [98] N. A. Tavenor, M. J. Murnin, W. S. Horne, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 2212-2215.
- [99] C. Vinson, P. Sigler, S. McKnight, *Science* **1989**, 246, 911-916.
- [100] Y. Jang, J. A. Champion, *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2188-2198.
- [101] L. Truebestein, T. A. Leonard, *BioEssays* **2016**, 38, 903-916.
- [102] T. C. Südhof, J. E. Rothman, *Science* **2009**, 323, 474-477.
- [103] E. H. C. Bromley, R. B. Sessions, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 928-930.
- [104] H. Gradišar, R. Jerala, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 100-106.
- [105] F. Thomas, A. L. Boyle, A. J. Burton, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 5161-5166.
- [106] R. O. Crooks, A. Lathbridge, A. S. Panek, J. M. Mason, *Biochemistry* **2017**, 56, 1573-1584.
- [107] G. Grigoryan, A. W. Reinke, A. E. Keating, *Nature* **2009**, 458, 859-864.
- [108] C. Negron, A. E. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 16544-16556.
- [109] N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya, B. S. Vollmar, J. P. Sumida, I. André, T. Gonen, T. O. Yeates, D. Baker, *Science* **2012**, 336, 1171-1174.
- [110] H. Gradišar, S. Božič, T. Doles, D. Vengust, I. Hafner-Bratkovič, A. Mertelj, B. Webb, A. Šali, S. Klavžar, R. Jerala, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 362-366.
- [111] R. L. Koder, J. L. R. Anderson, L. A. Solomon, K. S. Reddy, C. C. Moser, P. L. Dutton, *Nature* **2009**, 458, 305-309.
- [112] T. Zheng, J. Voskuhl, F. Versluis, H. R. Zope, I. Tomatsu, H. R. Marsden, A. Kros, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3649-3651.
- [113] N. H. Joh, T. Wang, M. P. Bhate, R. Acharya, Y. Wu, M. Grabe, M. Hong, G. Grigoryan, W. F. DeGrado, *Science* **2014**, 346, 1520-1524.

7.5) Literaturverzeichnis

- [114] H. R. Zope, F. Versluis, A. Ordas, J. Voskuhl, H. P. Spaink, A. Kros, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14497-14501.
- [115] J. Yang, Y. Shimada, R. C. L. Olsthoorn, B. E. Snaar-Jagalska, H. P. Spaink, A. Kros, *ACS nano* **2016**, *10*, 7428-7435.
- [116] A. A. McFarlane, G. L. Orriss, J. Stetefeld, *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *625*, 101-107.
- [117] Z. Chen, B. V. Popp, C. L. Bovet, Z. T. Ball, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 920-925.
- [118] Z. T. Ball, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 560-570.
- [119] Z. T. Ball, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 98-102.
- [120] K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3454-3461.
- [121] H. Yamashita, Y. Yano, K. Kawano, K. Matsuzaki, *BBA-Biomembr.* **2015**, *1848*, 1359-1366.
- [122] I. Nakase, S. Okumura, G. Tanaka, K. Osaki, M. Imanishi, S. Futaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7464-7467.
- [123] I. Nakase, N. Ueno, M. Katayama, K. Noguchi, T. Takatani-Nakase, N. B. Kobayashi, T. Yoshida, I. Fujii, S. Futaki, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 317-320.
- [124] I. J. Uings, S. N. Farrow, *Mol. Pathol.* **2000**, *53*, 295-299.
- [125] M. H. Ali, B. Imperiali, *Biorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5013-5020.
- [126] S. Ferré, V. Casadó, L. A. Devi, M. Filizola, R. Jockers, M. J. Lohse, G. Milligan, J.-P. Pin, X. Guitart, *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 413-434.
- [127] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell* **2010**, *141*, 1117-1134.
- [128] A. Citri, Y. Yarden, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7*, 505-516.
- [129] R. DeRose, T. Miyamoto, T. Inoue, *Pflugers Arch.* **2013**, *465*, 409-417.
- [130] H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J.-H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Cell* **2002**, *110*, 775-787.
- [131] N. F. Endres, K. Engel, R. Das, E. Kovacs, J. Kuriyan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 777-784.
- [132] Y. Yarden, J. Schlessinger, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1434-1442.
- [133] A. Arkhipov, Y. Shan, R. Das, Nicholas F. Endres, Michael P. Eastwood, David E. Wemmer, J. Kuriyan, David E. Shaw, *Cell* **2013**, *152*, 557-569.
- [134] A. Tomas, C. E. Futter, E. R. Eden, *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 26-34.
- [135] Nicholas F. Endres, R. Das, Adam W. Smith, A. Arkhipov, E. Kovacs, Y. Huang, Jeffrey G. Pelton, Y. Shan, David E. Shaw, David E. Wemmer, Jay T. Groves, J. Kuriyan, *Cell* **2013**, *152*, 543-556.
- [136] S. R. Needham, S. K. Roberts, A. Arkhipov, V. P. Mysore, C. J. Tynan, L. C. Zanetti-Domingues, E. T. Kim, V. Losasso, D. Korovesis, M. Hirsch, D. J. Rolfe, D. T. Clarke, M. D. Winn, A. Lajevardipour, A. H. A. Clayton, L. J. Pike, M. Perani, P. J. Parker, Y. Shan, D. E. Shaw, M. L. Martin-Fernandez, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13307.
- [137] X. Sun, A. Zhang, B. Baker, L. Sun, A. Howard, J. Buswell, D. Maurel, A. Masharina, K. Johnsson, C. J. Noren, M.-Q. Xu, I. R. Corrêa, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2217-2226.
- [138] X. Sun, F. Dusserre-Bresson, B. Baker, A. Zhang, P. Xu, C. Fibbe, C. J. Noren, I. R. Corrêa, M.-Q. Xu, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *88*, 34-41.
- [139] A. Ruscito, M. C. DeRosa, *Front. Chem.* **2016**, *4*, 14.
- [140] R. Ueki, A. Ueki, N. Kanda, S. Sando, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 579-582.
- [141] R. Ueki, S. Atsuta, A. Ueki, S. Sando, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6554-6557.
- [142] H. Kuai, Z. Zhao, L. Mo, H. Liu, X. Hu, T. Fu, X. Zhang, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9128-9131.
- [143] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.
- [144] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- [145] V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. McLaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, *Science* **2012**, *336*, 341-344.
- [146] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [147] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897.

7.5) Literaturverzeichnis

- [148] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 3-7.
- [149] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [150] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
- [151] H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 98-101.
- [152] F. Pellestor, *PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigations*, Nova Biomedical Books, **2007**.
- [153] Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1330-1336.
- [154] M. Moccia, M. F. A. Adamo, M. Saviano, *Artif. DNA PNA XNA* **2014**, *5*, e1107176.
- [155] K. Matsuura, M. Hibino, Y. Yamada, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 357-358.
- [156] V. L. Malinovskii, D. Wenger, R. Haner, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 410-422.
- [157] N. Spinelli, E. Defrancq, F. Morvan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4557-4573.
- [158] F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8592-8596.
- [159] F. Abendroth, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10504-10509.
- [160] B. A. R. Williams, C. W. Diehnelt, P. Belcher, M. Greving, N. W. Woodbury, S. A. Johnston, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17233-17241.
- [161] R. Liu, B. Jiang, H. Yu, J. C. Chaput, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1813-1817.
- [162] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4232-4236.
- [163] M. Marczynke, K. Gröger, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2384-2392.
- [164] T. Machida, A. Novoa, É. Gillon, S. Zheng, J. Claudinon, T. Eierhoff, A. Imbert, W. Römer, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6762-6766.
- [165] C. Scheibe, A. Bujotzek, J. Darnedde, M. Weber, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770-775.
- [166] C. Scheibe, S. Wedepohl, S. B. Riese, J. Darnedde, O. Seitz, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 236-250.
- [167] K. Gorska, K.-T. Huang, O. Chaloin, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7695-7700.
- [168] K. Gorska, J. Beyrath, S. Fournel, G. Guichard, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7742-7744.
- [169] E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 614.
- [170] A. V. Dix, S. M. Moss, K. Phan, T. Hoppe, S. Paoletta, E. Kozma, Z.-G. Gao, S. R. Durell, K. A. Jacobson, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12296-12303.
- [171] A. V. Dix, J. L. Conroy, K. M. George Rosenker, D. R. Sibley, D. H. Appella, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 425-429.
- [172] V. V. Demidov, N. V. Dokholyan, C. Witte-Hoffmann, P. Chalasani, H.-W. Yiu, F. Ding, Y. Yu, C. R. Cantor, N. E. Broude, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2052-2056.
- [173] N. Sancho Oltra, J. Bos, G. Roelfes, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2255-2258.
- [174] C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 242-245.
- [175] M. Erkelenz, C.-H. Kuo, C. M. Niemeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16111-16118.
- [176] J. Fu, Y. R. Yang, A. Johnson-Buck, M. Liu, Y. Liu, N. G. Walter, N. W. Woodbury, H. Yan, *Nat. Nano* **2014**, *9*, 531-536.
- [177] G. Ke, M. Liu, S. Jiang, X. Qi, Y. R. Yang, S. Wootten, F. Zhang, Z. Zhu, Y. Liu, C. J. Yang, H. Yan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7483-7486.
- [178] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539-544.
- [179] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [180] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882-1884.
- [181] J. Fu, M. Liu, Y. Liu, N. W. Woodbury, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5516-5519.
- [182] Y. Fu, D. Zeng, J. Chao, Y. Jin, Z. Zhang, H. Liu, D. Li, H. Ma, Q. Huang, K. V. Gothelf, C. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 696-702.
- [183] A. Angelin, S. Weigel, R. Garrecht, R. Meyer, J. Bauer, R. K. Kumar, M. Hirtz, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15813-15817.
- [184] S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science* **2012**, *335*, 831-834.

7.5) Literaturverzeichnis

- [185] M. Liu, J. Fu, C. Hejesen, Y. Yang, N. W. Woodbury, K. Gothelf, Y. Liu, H. Yan, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2127.
- [186] Y. Mou, J.-Y. Yu, T. M. Wannier, C.-L. Guo, S. L. Mayo, *Nature* **2015**, *525*, 230-233.
- [187] K. S. Palla, T. J. Hurlburt, A. M. Buyanin, G. A. Somorjai, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1967-1974.
- [188] N. D. Derr, B. S. Goodman, R. Jungmann, A. E. Leschziner, W. M. Shih, S. L. Reck-Peterson, *Science* **2012**, *338*, 662-665.
- [189] A. J. M. Wollman, C. Sanchez-Cano, H. M. J. Carstairs, R. A. Cross, A. J. Turberfield, *Nat. Nano* **2014**, *9*, 44-47.
- [190] C. Zambaldo, S. Barluenga, N. Winssinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 8-15.
- [191] Z. Gholami, Q. Hanley, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1820-1828.
- [192] J. D. Flory, C. R. Simmons, S. Lin, T. Johnson, A. Andreoni, J. Zook, G. Ghirlanda, Y. Liu, H. Yan, P. Fromme, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8283-8295.
- [193] S. A. Kazane, J. Y. Axup, C. H. Kim, M. Ciobanu, E. D. Wold, S. Barluenga, B. A. Hutchins, P. G. Schultz, N. Winssinger, V. V. Smider, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 340-346.
- [194] R. E. Kontermann, U. Brinkmann, *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 838-847.
- [195] S. Dickgiesser, N. Rasche, D. Nasu, S. Middel, S. Hörner, O. Avrutina, U. Diederichsen, H. Kolmar, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2158-2165.
- [196] A. Leonidova, C. Foerster, K. Zarschler, M. Schubert, H.-J. Pietzsch, J. Steinbach, R. Bergmann, N. Metzler-Nolte, H. Stephan, G. Gasser, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5601-5616.
- [197] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1220-1238.
- [198] Y. R. Yang, Y. Liu, H. Yan, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1381-1395.
- [199] J. B. Trads, T. Tørring, K. V. Gothelf, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1367-1374.
- [200] J. Fu, M. Liu, Y. Liu, H. Yan, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1215-1226.
- [201] R. M. Schweller, P. E. Constantinou, N. W. Frankel, P. Narayan, M. R. Diehl, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2304-2307.
- [202] E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2421-2424.
- [203] T. M. Nguyen, E. Nakata, M. Saimura, H. Dinh, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8487-8496.
- [204] D. Chang, E. Lindberg, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1444-1447.
- [205] L. Holtzer, I. Oleinich, M. Anzola, E. Lindberg, K. K. Sadhu, M. Gonzalez-Gaitan, N. Winssinger, *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 394-400.
- [206] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2828-2832.
- [207] O. Vazquez, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2850-2854.
- [208] L. Röglin, M. R. Ahmadian, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2704-2707.
- [209] L. Röglin, F. Altenbrunn, O. Seitz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 758-765.
- [210] F. Wang, X. Liu, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1098-1129.
- [211] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9458-9463.
- [212] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nat. Nano* **2007**, *2*, 275-284.
- [213] X. Qu, S. Wang, Z. Ge, J. Wang, G. Yao, J. Li, X. Zuo, J. Shi, S. Song, L. Wang, L. Li, H. Pei, C. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**.
- [214] S. Wang, L. Yue, Z. Shpilt, A. Cecconello, J. S. Kahn, J.-M. Lehn, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9662-9671.
- [215] T. Raschle, C. Lin, R. Jungmann, W. M. Shih, G. Wagner, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2448-2454.
- [216] R. Peri-Naor, T. Ilani, L. Motiei, D. Margulies, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9507-9510.
- [217] O. Soderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K.-J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.-G. Larsson, U. Landegren, *Nat. Meth.* **2006**, *3*, 995-1000.
- [218] G. J. Gu, M. Friedman, C. Jost, K. Johnsson, M. Kamali-Moghaddam, A. Plückthun, U. Landegren, O. Söderberg, *N. Biotechnol.* **2013**, *30*, 144-152.
- [219] T. N. N. Tran, J. Cui, M. R. Hartman, S. Peng, H. Funabashi, F. Duan, D. Yang, J. C. March, J. T. Lis, H. Cui, D. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14008-14011.

7.5) Literaturverzeichnis

- [220] R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4756-4761.
- [221] C. Lin, R. Jungmann, A. M. Leifer, C. Li, D. Levner, G. M. Church, W. M. Shih, P. Yin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 832-839.
- [222] M. J. Taylor, K. Husain, Z. J. Gartner, S. Mayor, R. D. Vale, *Cell* **2017**, *169*, 108-119.e120.
- [223] D. Y. Zhang, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17303-17314.
- [224] B. M. G. Janssen, E. H. M. Lempens, L. L. C. Olijve, I. K. Voets, J. L. J. van Dongen, T. F. A. de Greef, M. Merkx, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1442-1450.
- [225] B. M. G. Janssen, M. van Rosmalen, L. van Beek, M. Merkx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2530-2533.
- [226] T. Sano, C. Smith, C. Cantor, *Science* **1992**, *258*, 120-122.
- [227] N. Malou, D. Raoult, *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 295-302.
- [228] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 473-477.
- [229] S. M. Gustafsdottir, E. Schallmeiner, S. Fredriksson, M. Gullberg, O. Söderberg, M. Jarvius, J. Jarvius, M. Howell, U. Landegren, *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 2-9.
- [230] J. Biteen, K. A. Willets, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7241-7243.
- [231] H. Blom, J. Widengren, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7377-7427.
- [232] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 18911-18916.
- [233] G. Giannone, E. Hosy, F. Levet, A. Constals, K. Schulze, Alexander I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, R. Tampé, D. Choquet, L. Cognet, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1303-1310.
- [234] C. Flors, C. N. J. Ravarani, D. T. F. Dryden, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2201-2204.
- [235] C. Steinhauer, R. Jungmann, T. L. Sobey, F. C. Simmel, P. Tinnefeld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8870-8873.
- [236] J. J. Schmied, A. Gietl, P. Holzmeister, C. Forthmann, C. Steinhauer, T. Dammeyer, P. Tinnefeld, *Nat. Meth.* **2012**, *9*, 1133-1134.
- [237] J. J. Schmied, M. Raab, C. Forthmann, E. Pibiri, B. Wünsch, T. Dammeyer, P. Tinnefeld, *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1367-1391.
- [238] R. Jungmann, M. S. Avendano, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih, P. Yin, *Nat. Meth.* **2014**, *11*, 313-318.
- [239] S. S. Agasti, Y. Wang, F. Schueder, A. Sukumar, R. Jungmann, P. Yin, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3080-3091.
- [240] I. Nikić, G. Estrada Girona, J. H. Kang, G. Paci, S. Mikhaleva, C. Koehler, N. V. Shymanska, C. Ventura Santos, D. Spitz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16172-16176.
- [241] F. Schueder, M. T. Strauss, D. Hoerl, J. Schnitzbauer, T. Schlichthaerle, S. Strauss, P. Yin, H. Harz, H. Leonhardt, R. Jungmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4052-4055.
- [242] D. Y. Duose, R. M. Schweller, W. N. Hittelman, M. R. Diehl, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2327-2331.
- [243] D. Y. Duose, R. M. Schweller, J. Zimak, A. R. Rogers, W. N. Hittelman, M. R. Diehl, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 3289-3298.
- [244] R. M. Schweller, J. Zimak, D. Y. Duose, A. A. Qutub, W. N. Hittelman, M. R. Diehl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9292-9296.
- [245] J. Zimak, R. M. Schweller, D. Y. Duose, W. N. Hittelman, M. R. Diehl, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2722-2728.
- [246] M. Rudchenko, S. Taylor, P. Pallavi, A. Dechkovskaia, S. Khan, V. P. Butler Jr, S. Rudchenko, M. N. Stojanovic, *Nat. Nano* **2013**, *8*, 580-586.
- [247] C. Boucher, B. Liberelle, M. Jolicoeur, Y. Durocher, G. De Crescenzo, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1569-1577.
- [248] P. H. Hirel, M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 8247-8251.
- [249] C. Giglione, A. Boularot, T. Meinel, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1455-1474.
- [250] B. Martoglio, B. Dobberstein, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 410-415.
- [251] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723-6730.

7.5) Literaturverzeichnis

- [252] S. C. Miller, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4632-4635.
- [253] U. Reinhardt, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2016**, Peptidtemplat-vermittelte Transferreaktionen: Eine chemische Methode für die selektive Markierung von Proteinen auf lebenden Zellen (Dissertation)
- [254] I. L. Reich, A. F. Diaz, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5635-5637.
- [255] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633-645.
- [256] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [257] C. Iacobucci, S. Reale, J.-F. Gal, F. De Angelis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3065-3068.
- [258] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [259] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [260] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [261] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815.
- [262] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [263] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [264] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- [265] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, M. Badertscher, *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2001**.
- [266] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, 7., überarbeitete Auflage ed. (Eds.: M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2005**.
- [267] J. E. Hein, J. C. Tripp, L. B. Krasnova, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8018-8021.
- [268] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.
- [269] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848-4870.
- [270] N. J. Greenfield, W. E. Stafford, S. E. Hitchcock-Degregori, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 402-410.
- [271] B. K. Kobilka, *BBA-Biomembr.* **2007**, *1768*, 794-807.
- [272] C. D. Hanlon, D. J. Andrew, *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 3533-3542.
- [273] J. Lotze, Dissertation, Universität Leipzig (Leipzig), **2016**, Peptide-Templated Acyl Transfer as Novel Strategy for Live Cell Imaging (Dissertation)
- [274] M. A. Behlke, L. Huang, L. Bogh, S. Rose, E. J. Devor, Integrated DNA Technologies, Technical Bulletin, **2005**.
- [275] L. Wang, A. K. Gaigalas, J. Blasic, M. J. Holden, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2004**, *60*, 2741-2750.
- [276] J. Huotari, A. Helenius, *EMBO J.* **2011**, *30*, 3481-3500.
- [277] P. Nagy, J. Claus, T. M. Jovin, D. J. Arndt-Jovin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 16524-16529.
- [278] K. Noga, H. Christine, T. J. Jacob, C. N. Edouard, W. B. Antony, H. A. C. Andrew, *Phys. Biol.* **2011**, *8*, 066002.
- [279] A. Sorkin, M. McClure, F. Huang, R. Carter, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1395-1398.
- [280] N. Kozier, M. P. Kelly, S. Orchard, A. W. Burgess, A. M. Scott, A. H. A. Clayton, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3581-3590.
- [281] S. Derer, P. Bauer, S. Lohse, A. H. Scheel, S. Berger, C. Kellner, M. Peipp, T. Valerius, *J. Immunol.* **2012**, *189*, 5230-5239.
- [282] *Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives in Molecular Probes™*, Thermo Fisher Scientific, **2010**.
- [283] X. Tan, P. F. Lambert, A. C. Rapraeger, R. A. Anderson, *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 352-366.
- [284] M. Baumdick, Y. Brüggemann, M. Schmick, G. Xouri, O. Sabet, L. Davis, J. W. Chin, P. I. H. Bastiaens, *eLife* **2015**, *4*, e12223.
- [285] D. J. Arndt-Jovin, M. G. Botelho, T. M. Jovin, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014**, *6*.
- [286] J. K. L. Sinclair, E. V. Denton, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11232-11235.
- [287] D. T. Clarke, D. J. Rolfe, S. E. D. Webb, M. D. Winn, M. L. Martin-Fernandez, in *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* (Eds.: A. Mendez-Vilas, J. Diaz), Formatex Research Center, **2010**.
- [288] J. L. Macdonald-Obermann, L. J. Pike, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13570-13576.

7.5) Literaturverzeichnis

- [289] P. J. Verveer, F. S. Wouters, A. R. Reynolds, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2000**, *290*, 1567-1570.
- [290] I. Chung, R. Akita, R. Vandlen, D. Toomre, J. Schlessinger, I. Mellman, *Nature* **2010**, *464*, 783-787.
- [291] H. Park, A. Germini, S. Sforza, R. Corradini, R. Marchelli, W. Knoll, *Biointerphases* **2007**, *2*, 80-88.
- [292] R. A. Scheck, M. A. Lowder, J. S. Appelbaum, A. Schepartz, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1367-1376.
- [293] S. W. Watts, *Am J Physiol-Reg I* **2010**, *298*, R254-R260.
- [294] J. J. Maguire, A. P. Davenport, *Semin. Nephrol.* **2015**, *35*, 125-136.
- [295] M. P. Schneider, E. I. Boesen, D. M. Pollock, *Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.* **2007**, *47*, 731-759.
- [296] S. Rich, V. V. McLaughlin, *Circulation* **2003**, *108*, 2184-2190.
- [297] A. P. Davenport, K. A. Hyndman, N. Dhaun, C. Southan, D. E. Kohan, J. S. Pollock, D. M. Pollock, D. J. Webb, J. J. Maguire, *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 357-418.
- [298] N. J. Evans, J. W. Walker, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 483-492.
- [299] N. R. Tykocki, S. W. Watts, *Clin Sci* **2010**, *119*, 361-372.
- [300] D. Y. Zhang, G. Seelig, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 103-113.
- [301] X. Yang, Y. Tang, S. M. Traynor, F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14076-14082.
- [302] S. Kotani, W. L. Hughes, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6363-6368.
- [303] N. V. DelRosso, S. Hews, L. Spector, N. D. Derr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4443-4446.
- [304] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, M. D. O'Connor-McCourt, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1754-1763.
- [305] A. Mócsai, J. Ruland, V. L. J. Tybulewicz, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 387-402.
- [306] R. L. Geahlen, *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 414-422.
- [307] V. Seda, M. Mraz, *Eur. J. Haematol.* **2015**, *94*, 193-205.
- [308] E. A. Ottinger, M. C. Botfield, S. E. Shoelson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 729-735.
- [309] K. Fütterer, J. Wong, R. A. Grucza, A. C. Chan, G. Waksman, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 523-537.
- [310] H. Eberhard, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1349-1355.
- [311] K. Gröger, G. Gavins, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 14217-14221.
- [312] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Biorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5-23.
- [313] O. V. Krupnik, Y. S. Lazurkin, *Russ. J. Genet.* **2005**, *41*, 707-719.
- [314] A. T. Krueger, C. Kroll, E. Sanchez, L. G. Griffith, B. Imperiali, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2662-2666.
- [315] P. Lequoy, F. Murschel, B. Liberelle, S. Lerouge, G. De Crescenzo, *Acta Biomater.* **2016**, *29*, 239-247.
- [316] C. Boucher, J.-C. Ruiz, M. Thibault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicœur, Y. Durocher, G. De Crescenzo, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7021-7031.
- [317] F. Murschel, C. Fortier, M. Jolicœur, R. S. Hodges, G. De Crescenzo, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 965-975.
- [318] P. U. Le, A. E. G. Lenferink, M. Pinard, J. Baardsnes, B. Massie, M. D. O'Connor-McCourt, *Protein Expr. Purif.* **2009**, *64*, 108-117.
- [319] V. A. Kickhoefer, M. Han, S. Raval-Fernandes, M. J. Poderycki, R. J. Moniz, D. Vaccari, M. Silvestry, P. L. Stewart, K. A. Kelly, L. H. Rome, *ACS nano* **2009**, *3*, 27-36.
- [320] Y. Kitai, H. Fukuda, T. Enomoto, Y. Asakawa, T. Suzuki, S. Inouye, H. Handa, *J. Biotechnol.* **2011**, *155*, 251-256.
- [321] J. K. Pokorski, M. L. Hovlid, M. G. Finn, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2441-2447.
- [322] Y. Assal, Y. Mizuguchi, M. Mie, E. Kobatake, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1672-1677.
- [323] B. Liberelle, C. Boucher, J. Chen, M. Jolicœur, Y. Durocher, G. De Crescenzo, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2257-2266.
- [324] A. C. Dreux, D. J. Lamb, H. Modjtahedi, G. A. A. Ferns, *Atherosclerosis* **2006**, *186*, 38-53.
- [325] M. R. Schneider, E. Wolf, *J. Cell. Physiol.* **2009**, *218*, 460-466.
- [326] F. Saito, H. Noda, J. W. Bode, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1026-1033.
- [327] W. F. Heath, R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 6367-6371.

7.5) Literaturverzeichnis

- [328] T. M. Hackeng, J. A. Fernández, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, J. H. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 14074-14078.
- [329] J.-Y. Chang, L. Li, P.-H. Lai, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4845-4852.
- [330] J.-Y. Chang, P. Schindler, U. Ramseier, P.-H. Lai, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9207-9216.
- [331] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693-1702.
- [332] M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 509-514.
- [333] K. Gröger, Humboldt-Universität zu Berlin **2012**, Selektion CPP-bindender Peptide über Phagen-Display (Diplomarbeit)
- [334] D. Yang, M. R. Hartman, T. L. Derrien, S. Hamada, D. An, K. G. Yancey, R. Cheng, M. Ma, D. Luo, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1902-1911.
- [335] E. D. Levy, E. B. Erba, C. V. Robinson, S. A. Teichmann, *Nature* **2008**, *453*, 1262-1265.
- [336] P. C. Havugimana, G. T. Hart, T. Nepusz, H. H. Yang, A. L. Turinsky, Z. Li, P. I. Wang, D. R. Boutz, V. Fong, S. Phanse, M. Babu, S. A. Craig, P. Hu, C. Wan, J. Vlasblom, V. U. N. Dar, A. Bezginov, G. W. Clark, G. C. Wu, S. J. Wodak, E. R. M. Tillier, A. Paccanaro, E. M. Marcotte, A. Emili, *Cell* **2012**, *150*, 1068-1081.
- [337] J. A. Marsh, H. A. Rees, S. E. Ahnert, S. A. Teichmann, **2015**, *6*, 6394.
- [338] J. A. Marsh, S. A. Teichmann, *Ann.Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 551-575.
- [339] J. L. Ross, M. Y. Ali, D. M. Warshaw, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 41-47.
- [340] C. Dinant, M. S. Luijsterburg, T. Höfer, G. von Bornstaedt, W. Vermeulen, A. B. Houtsmuller, R. van Driel, *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 21-26.
- [341] A. Roloff, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2014**, Templatgesteuerte Reaktionen von Peptidnukleinsäuren (Dissertation)
- [342] H. Eberhard, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2012**, DNA-Phosphopeptid-Konjugate - DNA-gesteuerte Selbstorganisation von Liganden für Signalproteine (Dissertation)
- [343] S. Ficht, L. Röglin, M. Ziehe, D. Breyer, O. Seitz, *Synlett* **2004**, *2004*, 2525-2528.
- [344] B. J. H. Kuipers, H. Gruppen, *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 5445-5451.
- [345] A. M. Oelker, S. M. Morey, L. G. Griffith, P. T. Hammond, *Soft Matter* **2012**, *8*, 10887-10895.
- [346] M. Di Antonio, G. Biffi, A. Mariani, E.-A. Raiber, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11073-11078.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Katharina Gröger, dass ich die Arbeit eigenständig erstellt und die Dissertationsschrift dazu selbstständig verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel und Quellen, die nicht in der Arbeit genannt sind, verwendet.